Untersuchungen über den Phenylpropanstoffwechsel von Gewebekulturen von NICOTIANA TABACUM var. SAMSUN

von

Werner Thies

Göttingen

1965

1964

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544314_0006

Untersuchungen über den Phenylpropanstoffwechsel von

Gewebekulturen von NICOTIANA TABACUM var. SAMSUN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität
zu Göttingen

vorgelegt
von Werner T h i e s
aus Hildesheim

Göttingen 1965

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

D 7

Referent: Prof. Dr. A. Pirson
Korreferent: Prof. Dr. A. Trebst
Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1964

Seite

A. Einleitung 2

B. Methodik 4

C. Versuchsteil

1) Isolierung und Identifizierung der aus SAMSUN-Gewebekulturen extrahierbaren Phenylpropane 14

a) Fraktion G: Scopolin 17

b) Fraktion I: Chlorogensäure, Feruloylglukose 23

c) Fraktion K: Scopoletin, Dimethyläsculetin 27

d) Fraktion J: Feruloylchinasäure, Cumaroylchinasäure, Cumaroylglukose 33

e) Fraktion H 41

f) Fraktion F 48

g) Fraktionen C, D und E 52

2) Enzymatische Versuche

a) Versuche zur Biosynthese der Chlorogensäure 59

b) Versuche zur Biosynthese des Scopoletins 62

3) Fütterungsversuche mit Phenylalanin-C-14 65

D. Diskussion 81

Zusammenfassung 88

Literatur 9o

A. Einleitung

Der Phenylpropanstoffwechsel der Pflanzen hat in den letzten Jahren eine sehr intensive Bearbeitung erfahren, da einmal die Zwischenprodukte dieses Stoffwechselzweiges als Vorstufen des Lignins große Bedeutung haben (BRAUNS und BRAUNS 1960, FREUDENBERG 1962, NEISH 1960) und da zum anderen Phenylpropane Bestandteil einer Vielzahl weit verbreiteter Naturstoffe sind (KARRER 1958, BATHE-SMITH 1962). Die im Laufe dieser Untersuchungen erarbeiteten Vorstellungen über die Biosynthese der Zimtsäuren sind verschiedentlich zusammengefaßt dargestellt worden (REZNIK 1960, NEISH 1960, GRISEBACH und OLLIS 1961). Sie basieren in erster Linie auf Fütterungsversuchen, die mit markierten Substanzen an ganzen Pflanzen oder an ganzen Pflanzenorganen durchgeführt worden sind. Diesen Versuchen sind jedoch gewisse Grenzen gesetzt, die sich aus den Schwierigkeiten bei der Applikation markierter Verbindungen an Pflanzen ergeben.

Bei der höheren Pflanze ist der Ort der Stoffaufnahme meist nicht identisch mit dem Ort, an dem sich die zu untersuchenden Reaktionen abspielen. Diese Verschiedenheit von Aufnahmeort und Reaktionsort und der dazwischengeschaltete Transport wirken sich sehr nachteilig bei Kurzzeitversuchen aus, die allein die Kinetik des Ein- und Umbaues der gebotenen Substanzen zu verfolgen erlauben, und machen diese unter Umständen ganz unmöglich. Da häufig nach der Fütterung von Vorstufen der Zimtsäuren eine Vielfalt von markierten Produkten innerhalb kurzer Zeit aufgefunden wird, wäre es äußerst wichtig, die zeitliche Reihenfolge des Auftauchens der einzelnen Verbindungen zu kennen, um die Frage nach der Reaktionsfolge in der Zelle entscheiden zu können. Der Transport der markierten Substanzen in der Pflanze bringt zudem einen weiteren experimentellen Nachteil mit sich, da auf dem Transportweg Sekundärreaktionen erfolgen können, die das Bild der interessierenden Reaktion verwischen. Es wäre daher sehr wünschenswert, mit einem System zu arbeiten, bei dem dieser Unsicherheitsfaktor ausgeschlossen ist und das kurzfristige Markierungen erlaubt.

Ein derartiges System bietet sich in Zell- und Gewebekulturen höherer Pflanzen an, die sich zum Teil als Zellsuspensionen kultivieren und vermehren lassen (STREET 1963) und sich als sehr geeignete Objekte für Stoffwechselmessungen erwiesen haben (BERGMANN 1963). In den Suspensionskulturen bestehen die Schwierigkeiten, denen man beim Arbeiten mit ganzen Pflanzen begegnet, nicht: Stoffaufnahme und Reaktion erfolgen in ein und derselben Zelle, die frei im Medium suspendiert ist und aus diesem die verschiedensten Substrate direkt aufnehmen kann.

Ein Nachteil der Gewebekulturen, die meist auf optimales Wachstum hin selektioniert werden, besteht in der Uniformität ihres Stoffwechsels, der in erster Linie auf die Produktion der zum Wachstum benötigten Bausteine ausgerichtet ist und keine Besonderheiten zeigt. Es existieren jedoch eine Reihe von Gewebestämmen, die einen ausgeprägten Zimtsäurestoffwechsel aufweisen. Dieser ist experimentell beeinflußbar. So haben SARGENT und SKOOG (1960) und SKOOG und MONTALDI (1961) mitgeteilt, daß in Gewebekulturen von NICOTIANA TABACUM die Synthese von Scopoletinglykosiden durch Kinetin wesentlich gesteigert wird, und BERGMANN (1964) fand ebenfalls an Tabakgewebekulturen eine Stimulation der Ligninbildung durch Kinetin, die auf eine allgemeine Aktivierung des Phenylpropanstoffwechsels in den Geweben zurückgeführt werden konnte, während KOBLITZ (1962) über eine Steigerung der Ligninsynthese durch Kinetin in Gewebekulturen von DAUCUS CAROTA berichtet hat. Wir haben daher in der folgenden Arbeit den Zimtsäurestoffwechsel von Gewebekulturen von NICOTIANA TABACUM var. SAMSUN untersucht, die einmal zur Produktion von Lignin befähigt sind und die als Suspensionskulturen einzelner Zellen und wenigzelliger Aggregate gezogen werden können, und haben geprüft, wie weit sich derartige Zellsuspensionen für kurzfristige Markierungsversuche eignen. Da für die Markierungsversuche die Kenntnis der von den Kulturen synthetisierten Zimtsäuren und Zimtsäurederivate eine Voraussetzung ist, wurde zunächst versucht, den Zimtsäurestoffwechsel der Gewebe qualitativ zu erfassen und die einzelnen Verbindungen zu identifizieren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde sodann versucht, die Herkunft und die Zusammensetzung der hierbei aufgefundenen Verbindungen durch Markierungs- und Enzymversuche aufzuklären.

B. Methodik

1. Material und Kulturmethoden.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit einem Gewebekulturstamm von NICOTIANA TABACUM var. SAMSUN durchgeführt, der 1959 als Klon SC-1 aus einer Einzelzelle eines Wundkallusgewebes herangezogen und seitdem fortlaufend in vierwöchigen Passagen vermehrt worden ist (BERGMANN 1960). Die Gewebe wurden in 100 ml Erlenmeyerkölbchen bei 25° C in einem temperaturkonstanten Raum in dem diffusen Licht einer Glühlampe auf einer Nährlösung kultiviert, die Mineralsalze und Vitamine nach WHITE (1954), 2% Saccharose, 5% Cocosnußmilch, 0,8% Agar und 10^{-7} g/ml 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure als Wuchsstoff enthielt. Für die Fütterungsversuche wurden die Gewebe als Submerskulturen in einem flüssigen Medium gezogen. Um möglichst einheitliche Suspensionen zu erhalten, die eine gleichmäßige Suspensionsentnahme erlaubten, wurden die Zellsuspensionen vor den Versuchsansätzen durch ein feinmaschiges Nylonnetz filtriert und größere Zellaggregate entfernt.

2. Isolierung der Phenylpropankörper.

a) Herstellung der Rohextrakte.

Etwa 300 g Gewebe wurden auf einer Nutsche mit aqua dest. mehrmals kurz gewaschen und dann in 1 l siedendes Aceton eingebracht. Nach dreiminütigem Kochen wurde die Suspension abgekühlt und die Zellen mit einem ULTRA-TURRAX (Janke & Kunkel KG., Stauffen i.Br.) zertrümmert. Das Homogenat wurde anschließend abzentrifugiert, der Rückstand zweimal mit je 500 ml Aceton extrahiert und die vereinigten Extrakte in einem Umlaufverdampfer bei 40° C im Vakuum bis auf ca. 50 ml eingeengt. Der so erhaltene sirupöse Extrakt wurde mit reinem Aceton bis zu einer Konzentration von 75% versetzt. Ein hierbei entstehender Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen, da er, wie eine Prüfung ergab, nur sehr wenig Phenylpropankörper enthielt. Der klare, gelblich gefärbte Überstand wurde weiter eingeengt und auf die Chromatogramme aufgetragen.

b) Chromatographie.

Für die chromatographische Trennung verwandten wir die Papiersorte 2o43 mgl der Firma SCHLEICHER & SCHÜLL. Da dieses Papier, wie auch eine Reihe weiterer von uns geprüfter Papiere, organische Verunreinigungen in Mengen enthält, die sich bei präparativen Arbeiten sehr störend bemerkbar machen, verwandten wir für die letzten Reinigungsschritte stets Papiere, die wir zuvor 2 Tage im Durchlauf mit 75%igem Aceton gewaschen hatten. In einigen Fällen reichte auch die auf diesem Wege erzielte Reinheit der Papiere nicht aus, so daß wir die Dünnschichtchromatographie an rein anorganischen Schichten (Kieselgel G "MERCK") zur Reinigung unserer Substanzen heranziehen mußten.

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte bei Zimmertemperatur, in jedem Falle absteigend und in Ganzglasgefäßen (DESAGA, Heidelberg), die mindestestens 24 Stunden lang vor dem Einsetzen der Chromatogramme mit dem betreffenden Laufmittel beschickt worden waren. Wegen der Lichtempfindlichkeit einiger der untersuchten Stoffe chromatographierten wir grundsätzlich in einem verdunkelten Raum.

Als Fließmittel verwandten wir folgende Gemische:
n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5; Propanol/Ammoniak-Lösung (25%ig)/Wasser 1o:1:1; Benzol/Eisessig/Wasser 6:7:3 und o,o5 m Phosphatpuffer pH 7.

Das von PARTIDGE eingeführte Butanol/Eisessig/Wasser-Gemisch erwies sich dank seiner universellen Trenneigenschaften als besonders vorteilhaft bei der Auftrennung der Rohextrakte. Es zeigte eine geringe Störanfälligkeit gegenüber Verunreinigungen der zu trennenden Lösungen durch Salze, Überladungen der Chromatogramme u.ä. und erlaubte schon Vorhersagen über den Charakter der einzelnen Verbindungen, da die Trennung in besonders übersichtlicher Weise nach den Löslichkeitseigenschaften der einzelnen Substanzen erfolgte. Das Propanol/Ammoniak/Wasser-Gemisch besitzt den Vorteil, daß in ihm die Trennung von Stoffen gelingt, die in einem sauren Medium sehr einheitliche R_F-Werte besitzen (s.a. BEKEMEIER 1957). In den vorliegenden Untersuchungen erwies sich als besonders günstig, daß in ihm die in den Extrakten in größeren Mengen vorhandene Chlorogensäure am Startfleck zurückbleibt und so von anderen Substanzen quantitativ ab-

getrennt wird. Diese Vorteile wiegen unseres Erachtens die Nachteile auf, die sich aus der leichten Oxydation von o-Dihydroxy-Phenolen in diesem Laufmittel ergeben. Das Gemisch Benzol/Eisessig/Wasser leistet bei der Trennung der lipophilen Zimtsäuren und Cumarine sehr gute Dienste.

Wie Abb. 1 auf der folgenden Seite zeigt, gelingt mit ihm eine sichere Trennung der Zimtsäuren und Cumarine, sowie der Phenylmilch-, Phenylbrenztrauben- und der p-Hydroxy-Phenylmilchsäure.

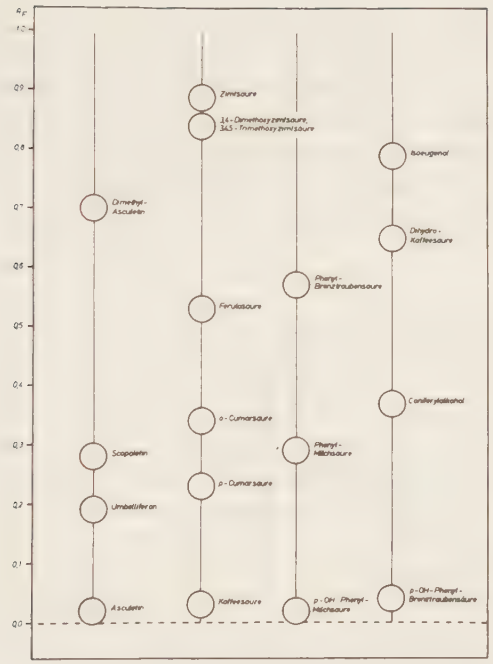


Abbildung 1

R_F-Werte einiger Phenylpropanderivate, die mit dem Gemisch Benzol/ Eisessig/Wasser 6:7:3 getrennt werden können.

Anstelle der von WILLIAMS (1955) für die Trennung der Zimtsäuren eingeführten 2%igen Essigsäure benutzten wir Phosphatpuffer von einem pH 7,o, in dem die cis- und trans-Formen der Zimtsäuren ebenfalls gut getrennt werden (Abb. 2). Gegenüber Essigsäure bietet Phosphatpuffer den Vorteil, daß empfindliche Substanzen in einem neutralen Medium gehalten werden können. Der Trenneffekt des Phosphatpuffers ist praktisch unabhängig von dem pH-Wert. Wir fanden für die R_F-Werte der Transformen einen leichten Anstieg von o,1 bei einer Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration um eine Zehnerpotenz innerhalb des pH-Bereichs von 4,8 bis 8,8, während die R_F-Werte der cis-Formen relativ konstant blieben.

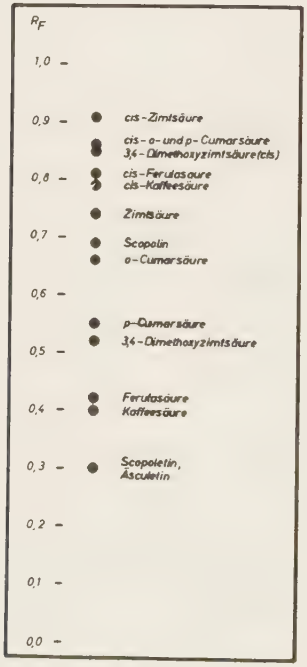


Abbildung 2

R_F-Werte einiger Zimtsäuren und Cumarine, die mit o,o5 m Phosphatpuffer pH 7 getrennt werden können.

3. Absorptionsspektren.

Für die Aufnahme der Absorptionsspektren stand ein ZEISS-Spektralphotometer QII mit Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke zur Verfügung. Die Messungen erfolgten mit Präparaten, die zuvor auf acetongewaschenem Papier möglichst weitgehend gereinigt und mit 96- bzw. 80%igem Äthanol DAB 6 über Nacht aus den Papieren eluiert worden waren. Als Leerwert diente das Eluat der entsprechenden Zone eines Bogens, der unter gleichen Bedingungen ohne Substanz chromatographiert worden war.

4. Hydrolysebedingungen.

a) Saure Hydrolyse.

50 µl einer ca. 5×10^{-4} molaren Substanzlösung wurden in einem Kleinreagenzglas (40 mm Länge, 7 mm Ø) mit 50 µl 2n HCl versetzt und 20 Min. lang bei 130°C autoklaviert. Nach dem Entfernen der Salzsäure im Umlaufverdampfer wurde das Hydrolysat für die anschließende Chromatographie mit 2 x 50 µl heißem 75%igem Aceton aufgenommen. Da Zimtsäuren unter diesen Bedingungen teilweise zerstört werden, wurde für die Spaltung von Zimtsäureestern der alkalischen Hydrolyse der Vorzug gegeben.

b) Alkalische Hydrolyse.

50 µl einer ca. 5×10^{-4} molaren Substanzlösung wurden in einem Kleinreagenzglas mit Hilfe eines Umlaufverdampfers bis zur Trockne eingeengt und anschließend mit 20 µl 5n KOH aufgenommen. Nach 15 Min. wurde das Hydrolysat mit 20 µl 6n HCl angesäuert und mit einer Schmelzpunktkapillare auf den Startfleck eines Chromatogrammes übertragen. Eine Entfernung des KCl erwies sich als unnötig, wenn die Prüfung auf Zimtsäuren in einem Benzol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm erfolgte, da hier Salze am Startfleck zurückbleiben und die Trennung nicht stören.

c) Emulsinhydrolyse.

50 µl einer ca. 5×10^{-4} molaren Substanzlösung wurden in einem Kleinreagenzglas bis fast zur Trockne eingeengt und anschließend mit 50 µl einer 5%igen Emulsinlösung in 0,05m Acetatpuffer, pH 4,6, versetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurde das Enzym mit 150 µl Aceton ausgefällt

und der Überstand für die nachfolgende Chromatographie bis auf ca. 5o µl eingeengt.

5. Radioautographie.

Für die Markierung der Zwischenverbindungen des Phenylpropanstoffwechsels verwendeten wir L-Phenylalanin-C-14 (U), das wir von der Firma THE RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham, Buckinghamshire, England, bezogen. Das Isotop hatte eine spezifische Aktivität von 9,8 mc/mM. Um auch schwächer strahlende Verbindungen gut sichtbar zu machen, ließen wir die entwickelten Chromatogramme acht Wochen auf die Röntgenfilme (Gaevert D 7, STRUKTURIX, 3o x 4o cm) einwirken. Für die Entwicklung des Filmmaterials benötigten wir mit dem Entwickler "GAEVERT G 2o9 A" 1o Minuten, für die Fixierung mit dem Röntgenschnellfixierbad "334" 2o Minuten. Die Messung der Impulsraten führten wir mit dem Methandurchflußzähler FH 9o/9o2 der Firma FRIESEKE & HOEPFNER, Erlangen-Bruck, durch. Das Zählrohr FH 4o7 verwendeten wir in der geschlossenen Form. Für Proben, die auf Aluminiumplanchetten aufgetragen wurden, stand der automatische Probenwechsel FH 448 zur Verfügung.

6. Identifizierungsreaktionen.

a) Nachweis von cis- und trans-Isomeren.

Für den Nachweis der cis- und trans-Isomeren eines Zimtsäurederivates machten wir von der Tatsache Gebrauch, daß durch UV-Bestrahlung die nichtfluoreszierende cis-Form weitgehend in die fluoreszierende trans-Form umgewandelt wird. Es wurden zwei gleiche Proben der fraglichen Substanz mit Phosphatpuffer chromatographiert, von denen die eine zuvor 5 Min. mit einer UV-Lampe bestrahlt worden war. Nach der Chromatographie wurde unter einer UV-Lampe das Verhältnis der cis- und trans-Formen in den beiden Proben miteinander verglichen. Beim Vorliegen von Cis-Trans-Isomerie war der Anteil der Cis-Form in der bestrahlten Probe immer höher als in der unbehandelten Kontrolle. Bestanden Zweifel, so wurden beide Formen getrennt eluiert und wieder chromatographiert, wobei jedes Eluat wieder in den cis- und trans-Formen aufzutreten hatte.

b) Nachweisreaktionen.

Die im folgenden aufgeführten Nachweisreaktionen sind Standartnachweise, die sich in der angegebenen Form bei unserer Arbeit besonders bewährt haben.

Reduzierende Substanzen.

2 g $AgNO_3$ + 5 ml Ammoniaklösung (25%ig) + 95 ml Wasser. Nach 1o Min. Erhitzen auf 1o5°C erscheinen dunkelbraune bis schwarze Flecken.

Aldehyde.

Überführen des Aldehyds in das 2,4-Dinitrophenylhydrazon mit o,o1 m 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2n HCl (3o Min., 2o°C) und Chromatographie des Hydrazons in wassergesättigtem n-Butanol. Das Hydrazon ist an der gelben Färbung zu erkennen.

Aminosäuren.

o,4 g Ninhydrin + 5 ml Eisessig + 95 ml n-Butanol. Nach 2o Min. Erwärmen bei 1o5°C erscheinen blauviolette bis rotviolette Flecken.

Chinasäure.

1 g $NaJO_4$ + 1oo ml Wasser.

Nach dem Trocknen des Chromatogramms:

o,5 g Piperazinhydrat + o,5 g Nitroprussid-Na + 1oo ml Wasser (getrennt lösen, erst kurz vor dem Sprühen mischen!). Nach 1o Min. Erhitzen auf 1o5°C erscheinen gelbe Flecken.

Glukose.

"BOEHRINGER"-Testkombination für die Blutzuckerbestimmung. Spezifischer Nachweis als roter Fleck.

Phenylbrenztraubensäure.

2 g $FeCl_3$ + 1oo ml Wasser.

Intensive Grünfärbung solange das Chromatogramm noch feucht ist.

Phenole.

a) PAULY's Reagenz.

5o ml o,3%ige Sulfanilsäurelösung in 8%iger HCl + 3 ml einer 5%igen $NaNO_2$-Lösung (unmittelbar vor Benutzen mischen).

Nach dem Trocknen des Chromatogramms:

2o g Na_2CO_3 + 1oo ml Wasser.

Es erscheinen Flecken in verschiedenen Farbtönen.

b) Reagenz nach FOLIN-CIOCALTEU.

25 ml "MERCK"-Stammlösung + 75 ml Wasser.

Nach dem Trocknen des Chromatogramms:

2o g Na_2CO_3 + 1oo ml Wasser.

Blaugraue Farbflecken.

o-Dihydroxy-Phenole.

a) HÖPFNERs Reagenz.

1 g $NaNO_2$ + 1o ml Eisessig + 9o ml Wasser.

Gelbe Flecken.

b) BENEDICTs Reagenz.

1,73 g $CuSO_4$ + 17,3 g Na-Citrat + 1o g wasserfreies Na_2CO_3 + 1oo ml Wasser.

o-Dihydroxy-Phenole löschen die Hintergrundfluoreszenz des Papiers.

c) Reagenz nach PRIDHAM.

o,1 m wässrige Na-Molybdatlösung.

Orange-braune Flecken.

Shikimisäure.

1%ige wässrige Perjodatlösung.

Nach dem Trocknen des Chromatogramms:

3 ml Anilin + 97 ml Äthanol.

Rote Flecken auf gelbem Grund.

Organische Säuren.

2 g Glukose + 2 ml Anilin + 6o ml n-Butanol + 2o ml Äthanol + 2o ml Wasser.

Nach 1o Minuten bei 1o5°C: Braune Flecken.

Zucker:

o,93 g Anilin + 1,66 g Phthalsäure in 1oo ml wassergesättigtem n-Butanol.

Nach einigen Minuten bei 1o5°C:

Aldopentosen = rote Flecken,
Aldohexosen = braune Flecken.

7. Herkunft der Vergleichssubstanzen.

KARL ROTH, Karlsruhe:

p-Cumarsäure, o-Cumarsäure, Dihydrokaffeesäure, 3,4-Dimethoxyzimtsäure, Coniferylalkohol, Sinapinsäure, 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure, Chlorogensäure, Isochlorogensäure, Scopoletin, Äsculetin, Umbelliferon.

CALIFORNIA CORPORATION, Los Angeles:

Phenylbrenztraubensäure, Phenylmilchsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Shikimisäure.

SIGMA CHEMICAL COMP., St. Louis 18, Missouri, USA:

p-Hydroxy-Phenylbrenztraubensäure, p-Hydroxy-Phenylmilchsäure.

E. MERCK, Darmstadt:

Zimtsäure, Äsculin, Cumarin, D(-)-Chinasäure.

FLUKA AG., Buchs SG, Schweiz:

Isoeugenol.

C. Versuchsteil

1) Isolierung und Identifizierung der aus SAMSUN-Gewebekulturen extrahierbaren Phenylpropane.

Die Chromatographie eines Aceton-Rohextraktes aus den Geweben von NICOTIANA TABACUM mit der organischen Phase eines Gemisches von n-Butanol/Eisessig/Wasser als Laufmittel läßt auf den Chromatogrammen eine Fülle von Verbindungen hervortreten, die sich durch ihre Fluoreszenz unter der UV-Lampe zu erkennen geben. In Abbildung 3 ist ein derartiges Chromatogramm der Inhaltsstoffe aus einer 14 Tage alten Kultur wiedergegeben. Es sind deutlich die in Menge und Art verschiedenen Banden zu erkennen, von denen eine Reihe erst nach Besprühen mit 1 n NaOH sichtbar wird.

Um einen ersten Überblick über die Vielfalt der in den Verbindungen enthaltenen Phenylpropankörper zu bekommen, wurden Proben aus einem Rohextrakt der alkalischen und sauren Hydrolyse unterworfen, die freigesetzten Zimtsäuren und Cumarine mit salzsaurem Äther ausgeschüttelt und mit einem Gemisch von Benzol/Eisessig/Wasser chromatographiert. Auf diesem Wege konnten nach Hydrolyse mit 5n KOH (15 Min. bei Zimmertemperatur) die freien Zimtsäuren p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure und die Cumarine Scopoletin und Dimethyläsculetin nachgewiesen werden. Nach Hydrolyse mit 2n HCl (2o Min. bei 13o°C) fanden sich auf den Chromatogrammen neben Spuren von Dimethyläsculetin größere Mengen von Scopoletin, die darauf hinweisen, daß dieses Cumarin auch in einer gebundenen Form in den Geweben vorhanden sein muß, die unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse gespalten wird. Daneben traten einige schwach fluoreszierende Flecken auf, die Reste der bei der Hydrolyse zum größten Teil zerstörten Zimtsäuren darstellen. Mit diesen Versuchen ist ein erster Hinweis auf die in den Geweben synthetisierten Phenylpropankörper gegeben. Auffällig ist das Fehlen von Zimtsäure und Sinapinsäure, die als Intermediärprodukte des Zimtsäurestoffwechsels und als mögliche Ligninvorstufen in den Geweben zu erwarten waren und auf deren Vorkommen daher in den folgenden Versuchen besonders geachtet wurde.

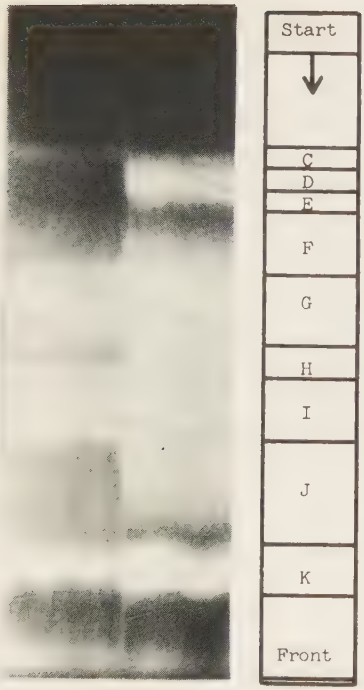


Abbildung 3

Chromatogramm eines Acetonextraktes 14 Tage alter Kulturen von NICOTIANA TABACUM var. SAMSUN mit Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5).
Die Zonen wurden durch Bestrahlen mit einer UV-Lampe (Strahlungsmaximum: 366 mμ) sichtbar gemacht.
Kurz vor der Aufnahme war der vom Betrachter aus rechte Teil des Chromatogrammes mit 1n NaOH besprüht worden.

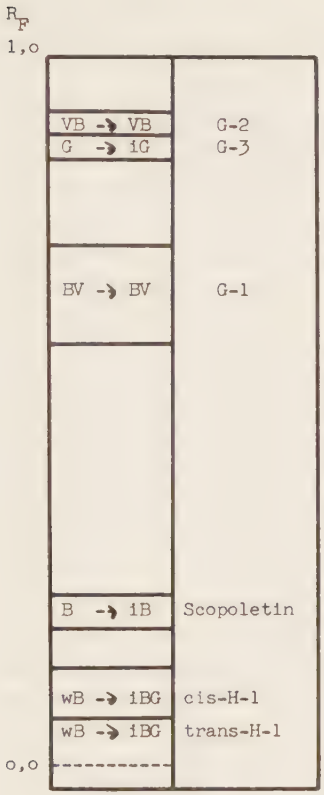
(Agfa-Tageslichtfilm CT 18, Blende 4,5; 1o sec; UV-Filter-KODAK-Farbabzug).

Für die weitere Aufklärung und Katalogisierung der auf den Butanol/Eisessig/Wasser-Chromatogrammen eines Rohextraktes zu Tage tretenden Verbindungen wurden die Chromatogramme in einzelne Fraktionen aufgeteilt, die mit großen lateinischen Buchstaben bezeichnet und im folgenden getrennt analysiert wurden (vgl. Abb. 3). Da der größte Teil der Fraktionen nicht einheitlicher Natur war, sondern jeweils mehrere, sich auf dem Chromatogramm überdeckende Verbindungen enthielt, war es notwendig, die Fraktionen durch Chromatographie mit verschiedenen Laufmitteln weiter aufzutrennen bis sich die hierbei erhaltenen Stoffe als chromatographisch rein erwiesen. Die für die einzelnen Trennungsschritte günstigen Laufmittel wurden empirisch von Fall zu Fall ermittelt, In der Reihenfolge der Identifizierungen folgten wir zunächst der quantitativen Verteilung der Fraktionen, da anzunehmen war, daß die in größeren Mengen in unseren Geweben auftretenden Verbindungen mit bereits bekannten und beschriebenen Phenylpropanderivaten identisch waren, deren Kenntnis die Identifizierung der in den übrigen Fraktionen enthaltenen Substanzen erleichtern würde.

Für die Kennzeichnung der Fluoreszenzfarben benutzten wir folgende Abkürzungen:

B = blau	d = dunkel
G = grün	i = intensiv
V = violett	l = hell
	w = schwach

Alle Farbangaben beziehen sich - wenn nichts anderes vermerkt ist - auf die Fluoreszenz der Stoffe nach Bestrahlen mit einer UV-Lampe mit einem Strahlungsmaximum bei 366 mμ. Ein Pfeil (-->) zwischen zwei Farbtönen symbolisiert das Bedampfen eines Stoffes mit Ammoniak. Die Farbangabe hinter dem Pfeil bezieht sich also auf die Fluoreszenz der betreffenden Verbindung nach Behandlung mit NH_3.



Fraktion G

Die Franktion G fällt sowohl durch ihre Menge, wie durch ihre kräftige blauviolette Fluoreszenz auf, die durch Bedampfen mit Ammoniak nicht verstärkt werden kann. Das Fluoreszenzverhalten sowie der R_F-Wert lassen in der Fraktion G Scopolin vermuten, dessen Aglykon Scopoletin wir bereits nach der Hydrolyse des Rohextraktes erhalten hatten.

Die Fraktion ist jedoch nicht einheitlich. Sie läßt sich in einem Wasserchromatogramm auftrennen in zwei scharf begrenzte Fraktionen G-2 und G-3, die Fraktion G-1, die den Hauptanteil der Fraktion G ausmacht, Scopoletin und Verunreinigungen durch H-1.

Fraktion G:
Die Unterfraktionen 1. Ordnung.
Fließmittel: Wasser.

G-1 (Scopolin)

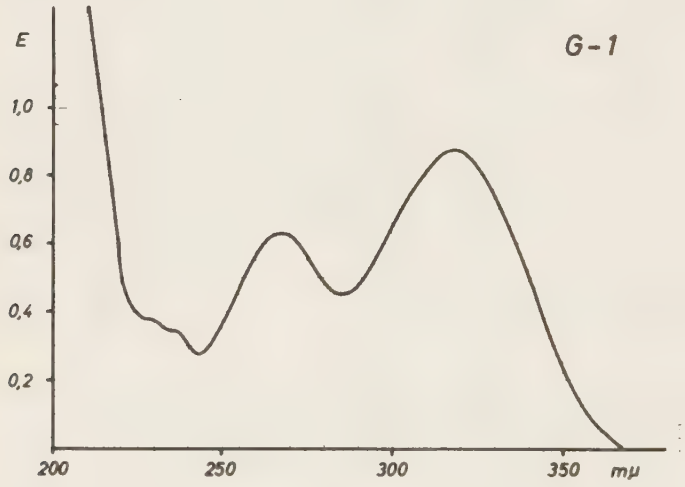
Die Fraktion G-1 konnte auf Grund ihres UV-Spektrums, der R_F-Werte in verschiedenen Laufmitteln sowie an Hand der Hydrolyseprodukte Scopoletin und Glukose eindeutig als Scopolin identifiziert werden.

Da von Kötter für ein von ihm aus SCOPOLIA CARNIOLICA isoliertes Scopolin ein Spektrum angegeben worden ist, das sowohl von dem von SARGENT und SKOOG (1961) mitgeteilten Scopolinspektrum wie von den von uns aufgenommenen Spektren wesentlich abweicht, haben wir aus Wurzeln von SCOPOLIA CARNIOLICA aus dem Botanischen Garten der Universität Göttingen Scopolin

isoliert und das Spektrum dieses Präparats aufgenommen. Wir erhielten ein Absorptionsspektrum, das vollkommen identisch mit dem Spektrum des Scopolins aus den Tabakgeweben ist.

Isolierungsschritte: a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Wasser
c) Butanol

UV-Spektrum:



Lösungsmittel: Äthanol, 96%ig

R_F-Werte: Butanol/Eisessig/Wasser.....o,52
Propanol/Ammoniak/Wasser.....o,45
Phosphatpuffer.....o,66
Wasser.....o,7o

Fluoreszenzeigenschaft: blauviolett --> blauviolett

Hydrolyse: Emulsin: Hydrolyseprodukte: Scopoletin und Glukose

1n HCl, 8o°C, 6o Min.: Hydrolyseprodukte: Scopoletin und Glukose

G-2

Die Fraktion G-2 läßt sich von der benachbarten Fraktion G-3 in einem Phosphatpufferchromatogramm trennen. Sie tritt in den Extrakten nur in kleinen Mengen auf, so daß ihrer Untersuchung gewisse Grenzen gesetzt sind. Durch kurzes Kochen in wässriger Lösung oder durch milde alkalische Hydrolyse (25% NH_3, 3o Min. bei Zimmertemperatur) wird sie in Scopolin und eine unbekannte, nicht fluoreszierende Verbindung zerlegt. Eine Hydrolyse mit HCl oder Emulsin gibt entsprechend als Hydrolyseprodukte Scopoletin und Glukose.

Von SARGENT und SKOOG (1961) ist ebenfalls aus Gewebekulturen von N. tabacum (Wisconsin 38) eine ähnliche Substanz isoliert worden, die nach Aufkochen mit Wasser Scopolin gibt. Die Verbindung III_4 dieser Autoren weicht jedoch in ihrem chromatographischen Verhalten von unserer Fraktion G-2 ab, besitzt ein von unserer Substanz verschiedenes UV-Spektrum und liefert nach dem Aufkochen eine Ag^+ reduzierende Substanz.

Die mit Scopolin verglichen schnellere Wanderung von G-2 in einem Wasserchromatogramm läßt als unbekannte Komponente eine Substanz vermuten, die die Wasserlöslichkeit des Scopolins erhöht. Die Prüfung eines Hydrolysates mit Ag^+ zeigte jedoch, daß außer Glukose keine weiteren reduzierenden Zucker nachzuweisen waren.

Isolierungsschritte:
a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Phosphatpuffer (Abtrennung der Verunreinigung durch G-3)
c) Butanol/Eisessig/Wasser

R_F-Werte:

Butanol/Eisessig/Wasser	o,52 (o,5o)+
Propanol/Ammoniak/Wasser	o,15 (o,34)
Phophatpuffer	o,8o
Wasser	o,9o (o,68)

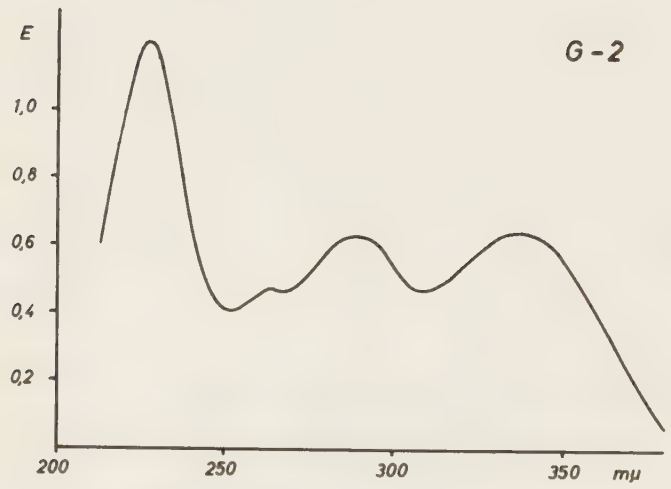
+: R_F-Werte der Autoren SARGENT und SKOOG für die Substanz III_4

Fluoreszenz-eigenschaft: blauviolett --> blauviolett

Hydrolyse: Emulsin: Hydrolyseprodukte: Scopoletin und Glukose

1n HCl, 8o°C, 6o Min.: Hydrolyseprodukte: Scopoletin und Glukose

UV-Spektrum:



Lösungsmittel: Äthanol, 8o%ig

G-3

Nach dem Abtrennen geringer Verunreinigungen durch G-2 und Chlorogensäure mittels eines Propanol/Ammoniak/Wasser-Chromatogrammes erscheint die Fraktion G-3 als chromtographisch einheitliche Substanz auf einem Butanol/Eisessig/Wasser- und einem reinen Wasserchromatogramm. In einem Phosphatpufferchromatogramm treten dagegen zwei Flecken mit deutlich verschiedenen R_F-Werten auf, die nach getrennter Elution und erneuter Chromatographie unter den gleichen Bedingungen jeder wieder zwei Flecken mit den ursprünglichen R_F-Werten geben, ein Verhalten, das charakteristisch ist für Verbindungen, deren cis- und trans-Formen im Gleichgewicht miteinander stehen.

Die Verstärkung der blaugrünen Fluoreszenz der Flecken nach dem Bedampfen mit NH_3 oder nach Besprühen mit BENEDICTS Reagenz zeigt das Vorhandensein einer freien phenolischen Hydroxylgruppe in der Verbindung an. Nach einer Hydrolyse mit 5n KOH (2o Min. bei Zimmertemperatur) ließ sich als Hydrolyseprodukt nur Ferulasäure nachweisen.

Die Möglichkeit, daß es sich bei der vorliegenden Verbindung um einen Ester einer Aldohexose oder Aldopentose handelt, konnte ausgeschlossen werden. Einmal erfolgte mit Emulsin keine Spaltung, zum anderen verliefen Teste mit Anilinphthalat nach einer alkalischen Hydrolyse negativ. Ebenso konnte ausgeschlossen werden, daß ein Ester der Chinasäure mit der Ferulasäure vorliegt, denn die fragliche Feruloylchinasäure zeigt ein anderes chromatographisches Verhalten (vgl. S. 33).

Da von HANSON und ZUCKER (1963) kürzlich ein Zimtsäureester der Shikimisäure (O-p-Cumaroylshikimisäure) aus Kartoffelknollen beschrieben worden ist, haben wir geprüft, ob in unserem Fall der analoge Ferulasäureester der Shikimisäure vorliegt und nach den Angaben von CARTWRIGHT und ROBERTS (1955) sowie von YOSHIDA und HASEGAWA (1957) das Hydrolysat auf Shikimisäure getestet. Die Versuche ergaben jedoch kein eindeutig positives Ergebnis, was möglicherweise an der geringen Empfindlichkeit der Nachweisreaktionen für Shikimisäure und an den uns zur Verfügung stehenden Substanzmengen liegt.

Isolierungsschritte:

a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Propanol/Ammoniak/Wasser
(Abtrennung der Verunreinigungen durch G-2 und Chlorogensäure)
c) Butanol/Eisessig/Wasser

R_F-Werte:

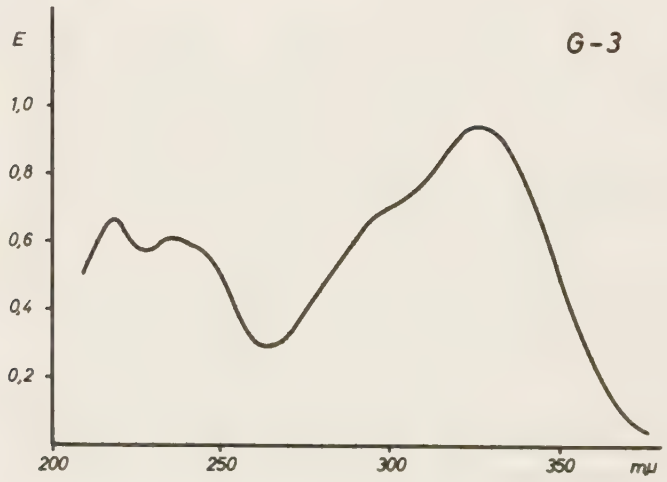
Butanol/Eisessig/Wasser.....o,53
Propanol/Ammoniak/Wasser....o,o9
Phosphatpuffer.....o,6o
o,75
Wasser.....o,87
Benzol/Eisessig/Wasser.....o,oo

Fluoreszenz-
eigenschaft: blaugrün --> verstärkt blaugrün

Hydrolyse: Emulsin: Keine Hydrolyse

5n KOH, 2o Min., 2o°C: Hydrolyseprodukt: Ferulasäure

UV-Spektrum:



Lösungsmittel: Äthanol, 8o%ig

Fraktion I

Die Zone I stellt die zweitstärkste Bande auf einem Butanolchromatogramm des Rohextraktes dar, die sich durch ihre Fluoreszenz unter der UV-Lampe bemerkbar macht. Die Fluoreszenz ist schwach blau und hellt sich nach Bedampfen mit NH_3 zu einem kräftigen Gelbgrün auf. Im Tageslicht erscheint die Bande - besonders nach längerer Lagerung der Chromatogramme - häufig leicht braun gefärbt. Diese Eigenschaften und der R_F-Wert lassen vermuten, daß in der Fraktion I in erster Linie Chlorogensäure enthalten ist. Für diese Annahme spricht ferner die nach Sprühen mit BENEDICTs Reagenz beobachtete Fluoreszenzlöschung, die das Vorliegen von o-Dihydroxyverbindungen in der Fraktion anzeigt.

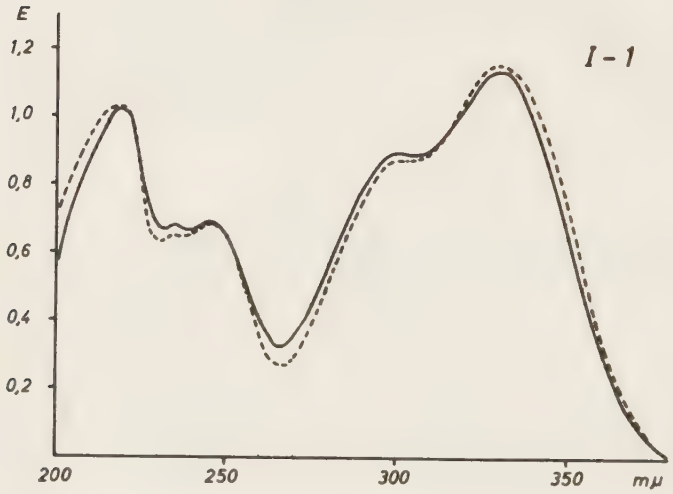
Die Franktion I läßt sich in einem Propanol/Ammoniak/Wasser-Chromatogramm in zwei Unterfraktionen zerlegen; während der Hauptanteil der Fraktion I-1 am Startfleck zurückbleibt, erscheint auf dem Chromatogramm eine zweite Fraktion I-2 mit einem R_F-Wert von o,3o. Die Chromatographie in dem alkalischen Laufmittel hat zur Folge, daß ein Teil der Fraktion I-1 oxydiert wird. Dieser Nachteil wurde in Kauf genommen, da es nur auf dem angegebenen Weg sicher gelang, die Fraktion I-2 von I-1 abzutrennen und da die entstehenden Oxydationsprodukte mit einem Butanol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm wieder leicht von I-1 getrennt werden können.

I-1 (Chlorogensäure)

Wie zu erwarten, ließ sich die Fraktion I-1 als Chlorogensäure identifizieren. Die Identifizierung stützt sich auf den Nachweis von Kaffeesäure und Chinasäure nach der Hydrolyse von I-1, dem Vergleich der R_F-Werte mit den R_F-Werten von Chlorogensäure bekannter Herkunft in verschiedenen Lösungsmitteln und der Übereinstimmung des UV-Spektrums mit dem Spektrum der Vergleichssubstanz.

Isolierungsschritte:
a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Propanol/Ammoniak/Wasser
c) Butanol/Eisessig/Wasser
d) Wasser (konzentrierte schmale Bande!)

UV-Spektrum:



Unterbrochene Kurve: Käufliche Chlorogensäure

Lösungsmittel: Äthanol, 96%ig

R_F-Werte:
Butanol/Eisessig/Wasser.....o,63
Propanol/Ammoniak/Wasser.....o,03
Phosphatpuffer.....o,58
o,74
Wasser.....o,8o

Fluoreszenz-eigenschaft: schwach blau --> verstärkt grün

Hydrolyse: Emulsin: Keine Hydrolyse

5n KOH, 5 Min., 2o°C: Hydrolyseprodukte: Kaffeesäure und Chinasäure

I-2 (1-Feruloyl-ß-D-Glukose)

Nach saurer und alkalischer Hydrolyse sowie nach Inkubation mit Emulsin lassen sich in dem Hydrolysat von I-2 Ferulasäure und Glukose nachweisen. Da I-2 eine freie phenolische Hydroxylgruppe besitzt, wie aus der Fluoreszenzverstärkung nach Behandlung mit NH_3 und BENEDICTs Reagenz folgt, muß die Glukose mit der Carboxlgruppe der Ferulasäure verestert sein.

Von HARBORNE und CORNER (1961) ist eine 1-Feruloyl-ß-D-Glukose beschrieben worden, deren UV-Spektrum, Fluoreszenzeigenschaften und R_F-Werte in verschiedenen Lösungsmitteln eine gute Übereinstimmung mit den Werten unserer Verbindung zeigen. Wir nehmen daher an, daß I-2 mit 1-Feruloyl-ß-D-Glukose identisch ist.

Isolierungsschritte:

a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Propanol/Ammoniak/Wasser
c) Wasser
d) Butanol/Essigsäure/Wasser

R_F-Werte:

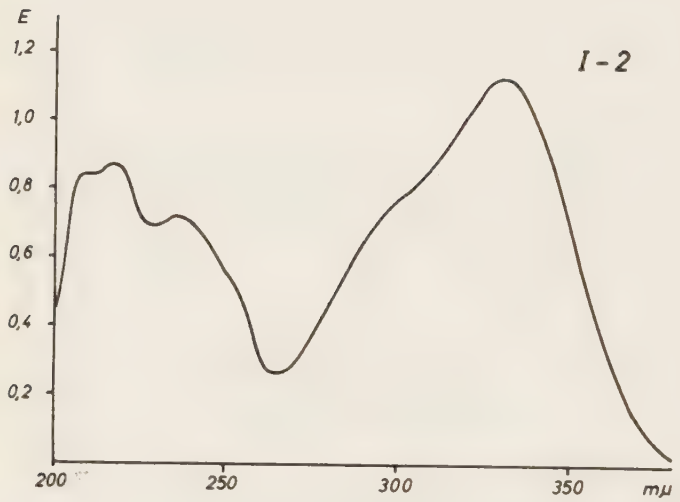
Butanol/Eisessig/Wasser	o,59	(o,57)+
Propanol/Ammoniak/Wasser	o,28	
Phosphatpuffer	o,58	
	o,66	
Wasser	o,66	(o,64)
	o,75	(o,73)
Benzol/Eisessig/Wasser	o,oo	

+: R_F-Werte nach HARBORNE und CORNER (1961)

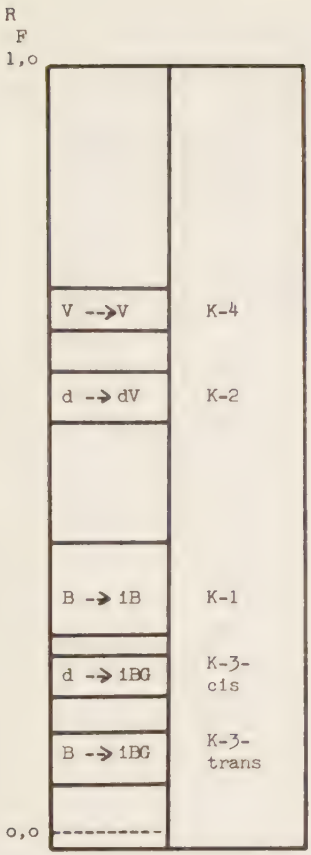
Fluoreszenz-eigenschaft: blau --> verstärkt blaugrün

Hydrolyse: Nach Hydrolyse durch Emulsin, 1n HCl (13o°C, 2o Min.) oder 5n KOH (15 Min., 2o°C) können jeweils Ferulasäure und Glukose nachgewiesen werden.

UV-Spektrum:



Lösungsmittel: Äthanol, 96%ig



Fraktion K

Die Fraktion K enthält die in Wasser schlecht löslichen Komponenten des Rohextraktes, unter denen die freien Zimtsäuren und Cumarine zu erwarten sind. Eine Auftrennung der Gesamtfraktion in 5 Unterfraktionen gelingt gut mit einem Benzol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm, wobei für präparative Zwecke vorteilhaft im Durchlauf gearbeitet wird, um eine optimale Trennung zu erhalten.

Zwei der Unterfraktionen -K-3 cis und K-3 trans- ließen sich einer Verbindung zuordnen, die bereits auf dem Benzol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm in der cis- und trans-Form erscheinen, so daß die Fraktion K im ganzen vier Verbindungen enthält. Auffällig ist, daß in ihr keine freien Zimtsäuren nachzuweisen waren.

Fraktion K: Die Unterfraktionen 1. Ordnung
Fließmittel: Benzol/Essigsäure/Wasser, 6:7:3

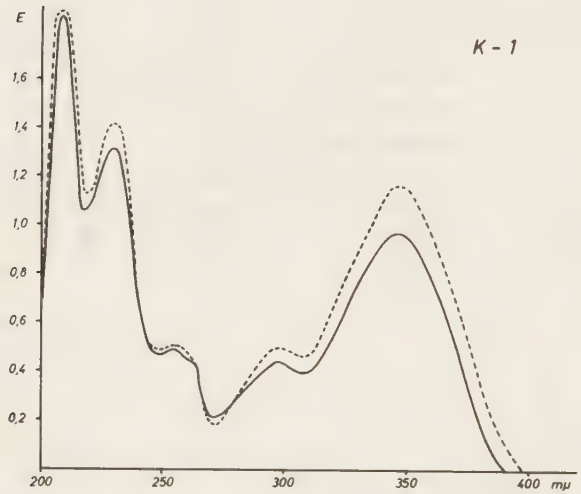
K-1 (Scopoletin)

Den mengenmäßig größten Anteil der Fraktion K stellt die Verbindung K-1, die durch ihre starke blaue Fluoreszenz auffällt und die als Scopoletin identifiziert werden konnte. Die Identifizierung erfolgte an Hand

1.) des UV-Spektrums der Verbindung, das vollkommene Übereinstimmung mit dem Spektrum reinen Scopoletins und dem von SARGENT und SKOOG (1961) angegebenen Scopoletin-Spektrum zeigte, und
2.) der Übereinstimmung der R_F-Werte der Testsubstanz mit den R_F-Werten von K-1 in verschiedenen Lösungsmitteln.

Isolierungsschritte:
a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Benzol/Eisessig/Wasser
c) Butanol/Essigsäure/Wasser

UV-Spektrum:



Unterbrochene Kurve: Käufliches Scopoletin
Lösungsmittel: Äthanol, 96%ig

R_F-Werte:

Butanol/Eisessig/Wasser	0,83
Propanol/Ammoniak/Wasser	0,45
Phosphatpuffer	0,30
Wasser	0,24
Benzol/Eisessig/Wasser	0,28

Fluoreszenz-eigenschaft: blau --> verstärkt blau

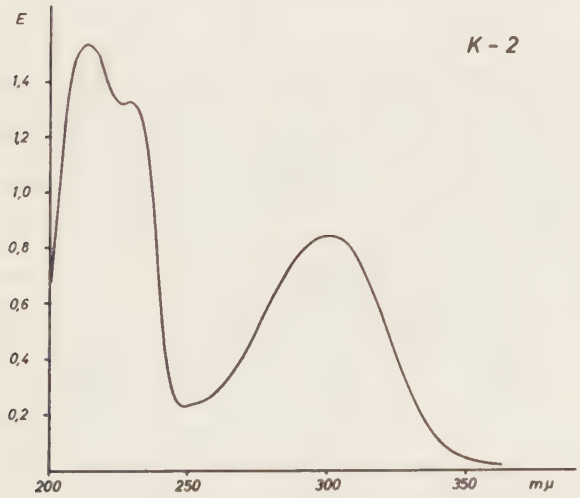
K-2

K-2 erscheint erst nach Bedampfen mit NH_3 als dunkelviolett fluoreszierende Bande, die in keinem der Fließmittel, die Zimtsäuren in ihre cis- und trans-Form trennen, in Form von Doppelflecken auftritt. Ein Vergleich der für K-2 ermittelten Daten mit Angaben in der Literatur ergab keinen näheren Hinweis auf die Struktur der Verbindung.

Da K-2 in Fütterungsversuchen mit Phenylalanin-C-14 nicht markiert erschien, wurde von einer weiteren Analyse im Rahmen dieser Arbeit abgesehen.

Isolierungsschritte:
a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Benzol/Eisessig/Wasser
c) Wasser

UV-Spektrum:



Lösungsmittel: Äthanol, 96%ig

R_F-Werte: Butanol/Eisessig/Wasser...o,85
Phosphatpuffer.....o,48
Wasser.....o,55
Benzol/Eisessig/Wasser....o,69

Fluoreszenz-eigenschaft: keine Fluoreszenz --> dunkelviolett

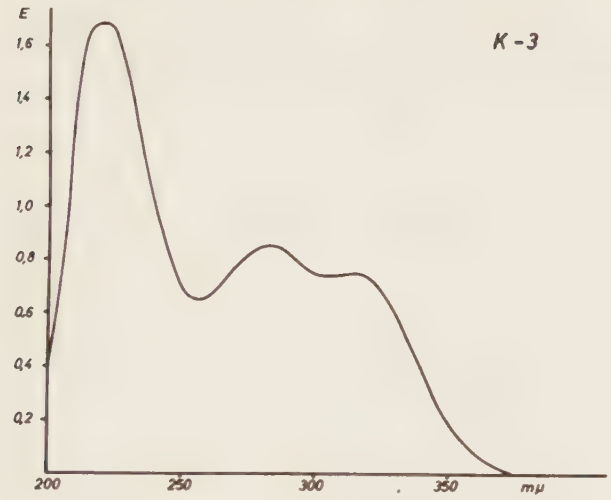
K-3

K-3 dürfte ein Kunstprodukt sein, das durch Dimerisierung von H-1 entsteht. Hierfür spricht, daß bei Lagerung von chromatographisch reinem H-1 in wässriger Lösung bei 0°C in geringen Mengen eine Substanz entsteht, die deutlich von H-1 verschieden und mit K-3 identisch ist. Die Substanz wandert in einem Wasserchromatogramm praktisch nicht; sie wird in einem Phosphatchromatogramm jedoch in eine cis- und trans-Form aufgetrennt, dagegen nicht wie H-1 in einem Butanol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm. Im Gegensatz zu H-1 gibt sie ferner die cis- und trans-Form bei der Chromatographie mit Benzol-Eisessig/Wasser und mit Propanol/Ammoniak/Wasser.

Die geringe Wasserlöslichkeit von K-3 und das veränderte UV-Spektrum weisen auf das Vorliegen eines Dimerisationsproduktes hin. Hierfür sprechen sowohl das Absorptionsmaximum bei 282 mμ wie der R_F-Wert in dem von FREUDENBERG und LEHMANN (1960) für die Chromatographie von dimeren Phenylpropanen entwickelten Xylol/Methyläthylketon/Formamid-Gemisch.

Isolierungsschritte:
a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Benzol/Eisessig/Wasser
c) Propanol/Ammoniak/Wasser

UV-Spektrum:



Lösungsmittel: Äthanol, 96%ig

R_F-Werte:

Butanol/Eisessig/Wasser	o,77
Propanol/Ammoniak/Wasser	o,67 (trans)
	o,79 (cis)
Phosphatpuffer	o,o2 (trans)
	o,39 (cis)
Wasser	o,o3
Benzol/Eisessig/Wasser	o,1o (trans)
	o,2o (cis)

Fluoreszenz-eigenschaft: schwach blau --> verstärkt blaugrün

K-4 (Dimethyläsculetin)

Die Ähnlichkeit des Spektrums von K-4 mit dem Spektrum von Scopoletin, die Unterschiede in den R_F-Werten und das Fehlen einer Fluoreszenzvertiefung nach Bedampfen mit Ammoniak legen die Annahme nahe, daß in K-4 das Dimethyläsculetin vorliegt.

Diese Annahme konnte durch den Vergleich mit reinem Dimethyläsculetin bestätigt werden. Das für den Vergleich verwandte Dimethyläsculetin wurde hierzu durch Methylieren von Scopoletin mit Methyljodid hergestellt. Sowohl die R_F-Werte in verschiedenen Lösungsmitteln wie das UV-Spektrum von K-4 stimmten mit den Daten der chromatographisch gereinigten Testsubstanz überein.

Isolierungsschritte:

a) Butanol/Essigsäure/Wasser
b) Benzol/Eisessig/Wasser
c) Wasser

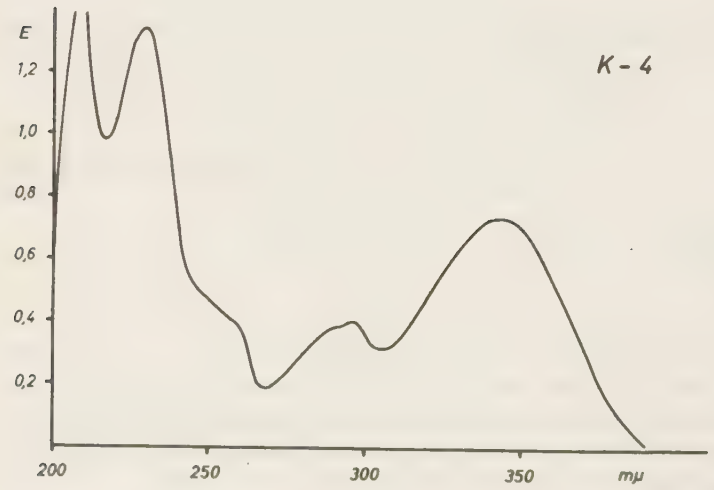
R_F-Werte:

Butanol/Eisessig/Wasser.....o,84
Propanol/Ammoniak/Wasser....o,78
Phosphatpuffer,.....o,33
Wasser.....o,36
Benzol/Essigsäure/Wasser....o,79

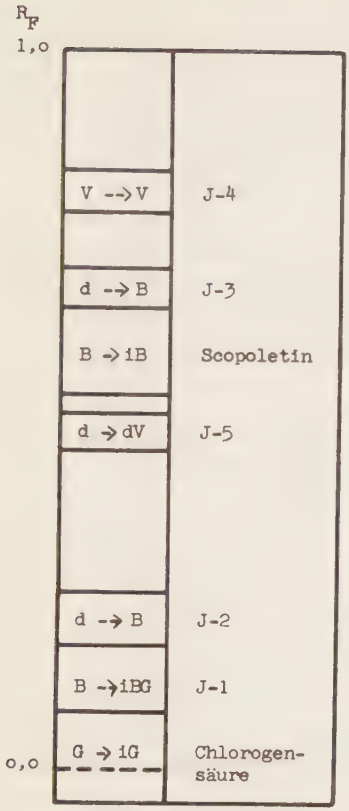
Fluoreszenzeigenschaft:

violett --> violett

UV-Spektrum:



Lösungsmittel: Äthanol, 96%ig



Fraktion J

In der Fraktion J sind eine größere Anzahl verschiedener Verbindungen enthalten, die zum Teil in geringen Mengen vorkommen und die nur durch mehrere aufeinander folgende Schritte voneinander zu trennen sind, so daß in einigen Fällen nur geringe Mengen der reinen Substanzen zur Verfügung standen.

Die in der Fraktion J enthaltenen Verunreinigungen aus den beiden Nachbarfraktionen Chlorogensäure und Scopoletin lassen sich mit einem Propanol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm sicher abtrennen. Hierbei wird die Fraktion J gleichzeitig in 5 Unterfraktionen getrennt, die einzeln weiter gereinigt werden müssen.

Fraktion J: Die Unterfraktionen 1. Ordnung

Fließmittel: Propanol/Ammoniak/Wasser
10:1:1

J-1 (3-O-Feruloylchinasäure)

J-1 läßt sich von den Resten der auf dem Propanol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm dicht benachbarten Fraktion J-1 über ein Phosphatpufferchromatogramm reinigen, da die trans-Form von J-1 langsamer wandert als die der Fraktion J-2 angehörenden Verbindungen. In einem Benzol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm wandert J-1 nicht.

Die Hydrolyse mit 5n KOH (15 Min. bei Zimmertemperatur) gibt als Hydrolyseprodukte Ferulasäure und Chinasäure. Da die Fluoreszenz von J-1 durch NH_3 oder BENEDICTs Reagenz verstärkt wird und sich eine phenolische Hydroxylgruppe mit der FOLIN-Reaktion nachweisen läßt, muß die Chinasäure mit der Carboxylgruppe der Ferulasäure verestert sein.

Ein entsprechender Ester ist kürzlich von HANSON und ZUCKER (1963) und von RUNECKLES (1963) isoliert und als 3-O-Feruloylchinasäureester beschrieben worden. Die Übereinstimmung der von diesen Autoren angegebenen Daten mit den von uns für J-1 ermittelten Werten erlaubt die Identifizierung von J-1 als 3-O-Feruloylchinasäure.

Isolierungsschritte:

a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Propanol/Ammoniak/Wasser
c) Phosphatpuffer (Abtrennung von J-2)
d) Butanol/Eisessig/Wasser

R_F-Werte:

Butanol/Eisessig/Wasser (12:3:5)	o,71	(o,7o)+
Propanol/Ammoniak/Wasser	o,12	
Benzol/Eisessig/Wasser	o,oo	
Phosphatpuffer	o,62	
	o,81	
2%ige Essigsäure	o,6o	(o,6o)
	o,74	(o,74)

+: Von RUNECKLES (1963) angegebene Werte

Fluoreszenzeigenschaften: blau --> gelbgrün

Hydrolyse:

Emulsin: Keine Veränderung der Substanz

3n HCl, 3o Min., 13o°C: Verbindung instabil

5n KOH, 15 Min., 2o°C: Als Hydrolyseprodukte können nachgewiesen werden: Ferulasäure (Benzolchromatogramm), Chinasäure (Butanolchromatogramm)

J-2 (3-O-p-Cumaroylchinasäure)

Bei der Prüfung der Fraktion J-2 des Propanol/Eisessig/Wasser-Chromatogrammes auf ihre chromatographische Reinheit zeigte sich, daß der Hauptteil der Fraktion in einem Benzol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm am Startfleck zurückbleibt und daß sich in einigen Fällen eine Bande mit einem R_F-Wert von o,18 abtrennt. Da wir diese Bande in unseren Versuchen nicht regelmäßig erhielten, wurde sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Während die am Startfleck zurückbleibende Substanz unter der UV-Lampe mit tiefblauer Farbe sichtbar wird, ist die zweite Bande durch Fluoreszenzlöschung bei Bestrahlen mit kurzwelligem UV-Licht charakterisiert.

Die Verbindung J-2 konnte als Chinasäureester der p-Cumarsäure identifiziert werden. Sie tritt in einem Chromatogramm mit Phosphatpuffer oder 2%iger Essigsäure als Laufmittel in cis- und trans-Formen auf und gibt nach Hydrolyse mit 5n KOH (15 Min. bei Zimmertemperatur) p-Cumarsäure und Chinasäure als Hydrolyseprodukte. Wie im Fall der 3-O-Feruloylchinasäure kann die Chinasäure nur über die Carboxylgruppe mit der Chinasäure verknüpft sein, da das Fluoreszenzverhalten der Verbindung ein freies phenolisches Hydroxyl anzeigt. Die von uns isolierte Verbindung stimmt in ihren Eigenschaften mit den von LEVY und ZUCKER (1960) angegebenen Daten für die 3-O-Cumaroylchinasäure überein und wurde daher als mit dieser identisch angesehen. Die Übereinstimmung der beiden Verbindungen konnte weiter durch enzymatische Versuche erhärtet werden, in denen die Umwandlung der Verbindung J-2 in Chlorogensäure gelang vgl. S. 59).

Isolierungsschritte:

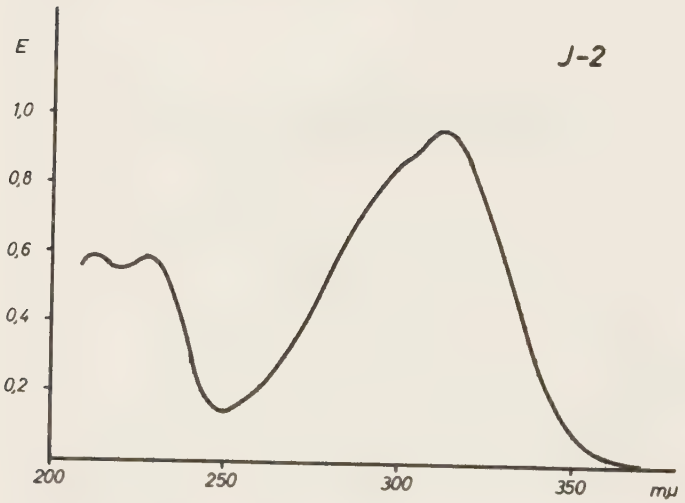
a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Propanol/Ammoniak/Wasser
c) Benzol/Eisessig/Wasser
d) Butanol/Eisessig/Wasser

R_F-Werte:

Butanol/Eisessig/Wasser	o,67 (o,67)+
Propanol/Ammoniak/Wasser	o,2o
Benzol/Eisessig/Wasser	o,oo
Phosphatpuffer	o,69
	o,8o
Essigsäure, 5%ig	o,74 (o,74)
	o,8o

+: Angaben der Autoren LEVY & ZUCKER (196o)

UV-Spektrum:



Lösungsmittel: Äthanol, 8o%ig

Fluoreszenz-eigenschaft: nicht sichtbar --> tiefblau

Hydrolyse:

Emulsin: Keine Veränderung der Substanz

3n HCl, 3o Min., 13o°C: Verbindung instabil

5n KOH, 15 Min., 2o°C: Als Hydrolyseprodukte können nachgewiesen werden: p-Cumarsäure (Benzolchromatogramm), Chinasäure (Butanolchromatogramm)

J-3

Da J-3 nur in geringen Mengen in unseren Extrakten vorhanden war, wurde es gemeinsam mit der benachbarten Scopoletinbande aus dem Propanol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm isoliert und in einem Phosphatpufferchromatogramm von dem Scopoletin getrennt.

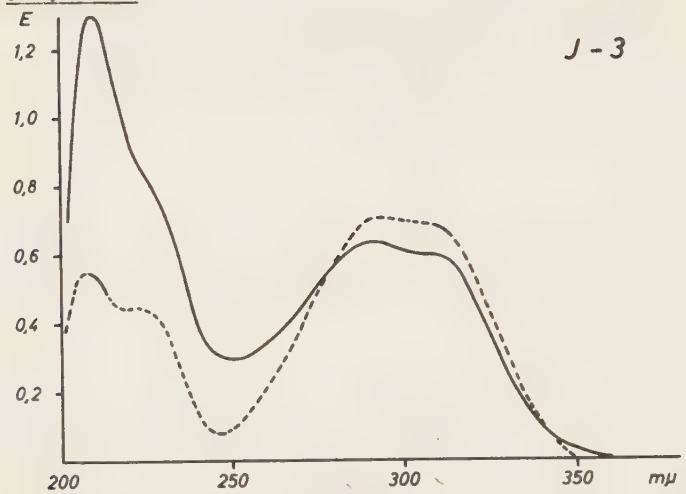
Die Verbindung fluoresziert erst nach Bedampfen mit Ammoniak mit tiefblauer Farbe und liegt in Wasser- und Phosphatchromatogrammen in cis- und trans-Formen vor. Das UV-Spektrum zeigt die charakteristische Gestalt des Spektrums der p-Cumarsäure, doch weichen die R_F-Werte der Verbindung von den R_F-Werten der p-Cumarsäure stark ab, was besonders auffällig bei der Chromatographie mit Wasser ist.

Das Verhalten von J-3 in Wasserchromatogramm und die ninhydrinpositive Reaktion der Verbindung stellen sie in die Gruppe der von uns aufgefundenen, unbekannten Zimtsäurederivate, die weiter unten im Zusammenhang besprochen werden.

Isolierungsschritte:

a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Propanol/Ammoniak/Wasser
c) Phosphatpuffer (Abtrennung von K-3 und Scopoletin, Auftreten von cis- und trans-J-3
d) Butanol/Eisessig/Wasser

UV-Spektrum:



Unterbrochene Kurve: p-Cumarsäure

Lösungsmittel: 96%iges Äthanol

R_F-Werte:

Butanol/Eisessig/Wasser	o,67
Propanol/Ammoniak/Wasser	o,53
Phosphatpuffer	o,6o
	o,8o
Wasser	o,o6
	o,11

Fluoreszenz-eigenschaft: keine Fluoreszenz --> dunkelblau

J-4

Aus der Verbindung J-4 wird durch Inkubation mit Emulsin oder durch saure Hydrolyse Scopoletin freigesetzt. Die Herabsetzung der Wasserlöslichkeit von J-4 gegenüber Scopolin, die sich aus dem Vergleich der R_F-Werte der beiden Verbindungen ergibt, weist auf einen substituierten Zucker als Kondensationspartner des Scopoletins in J-4 hin.

	Scopolin	J-4
Butanol/Eisessig/Wasser	o,61	o,77
dest. Wasser	o,67	o,63

Es gelang uns jedoch nicht, in dem Hydrolysat einen Zucker nachzuweisen, wofür allerdings auch die für die Nachweise verfügbaren Mengen verantwortlich sein können. Von einer eingehenden Analyse der Verbindung wurde abgesehen, da sie nur in geringen Mengen in den Geweben enthalten war, in den Markierungsversuchen mit Phenylalanin-C-14 unmarkiert blieb und ihr somit für unsere Fragestellung keine besondere Bedeutung zuzukommen schien.

Isolierungsschritte:
a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Propanol/Ammoniak/Wasser
c) Phosphatpuffer
d) Wasser

R_f-Werte:
Butanol/Eisessig/Wasser.....o,77
Propanol/Ammoniak/Wasser.....o,73
Benzol/Eisessig/Wasser.....o,07
Phosphatpuffer.....o,67
Essigsäure, 1o%ig.....o,73
Wasser.....o,63

Fluoreszenz-eigenschaft:
violett -> violett

Hydrolyse:
Emulsin: Hydrolyseprodukt: Scopoletin
3n HCl, 3o Min., 13o°C: Hydrolyseprodukt: Scopoletin

J-5 (1-p-Cumaroyl-ß-D-Glukose)

Nach alkalischer Hydrolyse lassen sich in dem Hydrolysat von J-5 p-Cumarsäure und Glukose nachweisen. Da die nichthydrolysierte Verbindung nach Behandlung mit NH_3 und BENEDICTs Reagenz Fluoreszenzverstärkung zeigt -

also eine freie phenolische Hydroxylgruppe besitzt -, muß die Glukose mit der Carboxylgruppe der p-Cumarsäure verestert sein.

BIRKOFER et. al. (1961) haben eine 1-p-Cumaroyl-ß-D-Glukose beschrieben, deren UV-Spektrum, Fluoreszenzeigenschaften und R_F-Wert in dem Lösungsmittel Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:2,2 eine gute Übereinstimmung mit den Werten unserer Verbindung zeigen. Wir nehmen daher an, daß J-5 mit 1-p-Cumaroyl-ß-D-Glukose identisch ist. Unter üblichen Ernährungsbedingungen gezogene Gewebe enthalten nur geringe Mengen des Esters. Durch Verfütterung von p-Cumarsäure ($1o^{-3}$ m) läßt sich die Konzentration jedoch erheblich steigern.

Isolierungsschritte:

a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Propanol/Ammoniak/Wasser
c) Wasser
d) Butanol/Eisessig/Wasser

R_F-Werte:

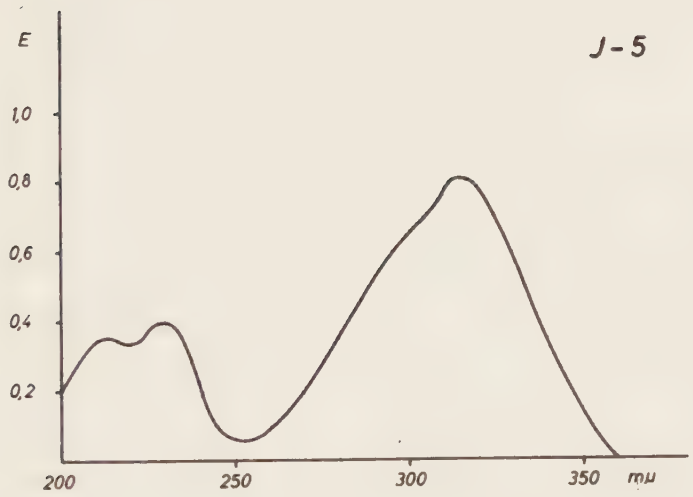
Butanol/Eisessig/Wasser	
4:1:2,2	o,68 (o,67)+
Propanol/Ammoniak/Wasser	o,45
Phosphatpuffer	o,66
	o,75
Wasser	o,67
	o,74

+: R_F-Wert nach BIRKOFER (1961)

Fluoreszenzeigenschaft: keine Fluoreszenz --> dunkelviolett

Hydrolyse: 5n KOH, 15 Min., $2o^{o}C$: Hydrolyseprodukte: p-Cumarsäure und Glukose

UV-Spektrum:



Lösungsmittel: Äthanol, 96%ig

Fraktion H

Die Fraktion H enthält neben der Hauptkomponente H-1 nur noch Verunreinigungen aus der Nachbarfraktion G, die sich in einem Wasserchromatogramm leicht von der am Startfleck zurückbleibenden trans-Form der Verbindung H-1 abtrennen lassen. Da sich bei einigen Testen aus dem Chromatographiepapier mitherausgelöste Verunreinigungen als sehr störend erwiesen, erfolgte die Reinigung von H-1 in diesen Fällen mittels Dünnschichtchromatographie an rein anorganischen Trägerschichten (Kieselgel G, MERCK).

H-1

Die Verbindung tritt in einem Phosphatpuffer- und Wasser- sowie in einem Butanol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm in Form ihrer cis- und trans-Isomeren auf, wobei in den Phosphatpuffer- und Wasserchromatogrammen die cis-Form rascher wändert als die trans-Form, während in einem Butanol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm die trans-Form durch einen größeren R_F-Wert gekennzeichnet ist. Nach Bedampfen mit Ammoniak geht die schwache Blaufluoressenz der Verbindung in eine kräftige blaugrüne Fluoressenz über, ein Verhalten, das zusammen mit den Farbreaktionen auf das Vorliegen eines Zimtsäurederivates mit einer freien phenolischen Hydroxylgruppe hinweist. Das freie phenolische Hydroxyl läßt sich auch eindeutig durch seinen Einfluß auf die UV-Absorption nachweisen: Im alkalischen Medium erfolgt eine markante bathochrome Verschiebung der Maxima, die auf das Vorliegen des Phenolations unter diesen Bedingungen zurückzuführen ist.

Das UV-Spektrum läßt weiterhin erkennen, daß der Zimtsäureanteil der Verbindung eine Feruloylstruktur besitzt. H-1 dürfte somit im Besitz einer Carbonylfunktion am C-9 sein (Abb. 6, Chromophortyp C der von FREUDENBERG und SCHUHMACHER (1956) für Phenylpropane aufgestellten Chromophortypreihe), die zu einer Carboxylgruppe gehören muß. Das Vorliegen einer Aldehydgruppierung konnte ausgeschlossen werden, da mit 2,4 Dinitrophenylhydrazin keine Bildung eines Hydrazons beobachtet werden konnte.

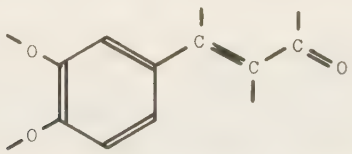


Abbildung 6

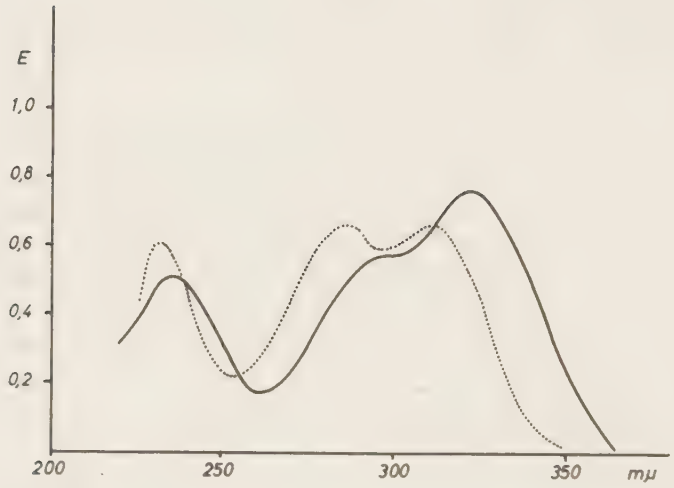
Im Gegensatz zur freien Ferulasäure, die nach Neutralisation mit Na-Acetat in äthanolischer Lösung eine deutliche Verschiebung der Absorptionsmaxima nach kürzeren Wellenlängen zeigt (s. Abb. 4), erfolgt bei H-1 keine Veränderung der Lage der Maxima nach dem Zusatz von Na-Acetat (s. Abb.5). Um auszuschließen, daß H-1 bereits vor der Zugabe von Na-Acetat in neutralisierter Form vorlag, haben wir auch die Spektren in Phosphat-Citrat-Puffer bei pH 3,15 und pH 7,1 gemessen und dabei ebenfalls keine Verschiebung

der Maxima beobachtet. Nach JURD (1957) ist das Ausbleiben des Hypsochromeffektes bei Säuren mit einer zum Benzolkern konjugierten Carboxylgruppe ein Zeichen dafür, daß die Carboxylgruppe nicht frei vorliegt. Einen weiteren Hinweis dafür, daß H-1 keine freie Carboxylgruppe besitzt, liefert die Tatsache, daß es nicht gelingt, H-1 aus einer salzsauren wässrigen Lösung mit Äther auszuschütteln.

Versuche, die Esternatur der Verbindung nachzuweisen, führten mit den üblichen Methoden zu keinem Ergebnis. Hydroxamsäureteste (CHERONIS & ENTRIKIN, 1961) verliefen ebenso wie Hydrolyseversuche mit 3n HCl (2o Min. bei 13o°C) und 5n KOH (15 Min. bei Zimmertemperatur) negativ. Auch nach 48stündiger Einwirkung von 6n HCl und 96%iger Ameisensäure (1:1) im Bombenrohr unter Stickstoffatmosphäre bei 1o5°C konnte keine Spaltung der Verbindung beobachtet werden. Dieses Verhalten schließt aus, daß ein Ester mit einem einfachen Zucker oder ein Depsid vorliegt und macht es sehr unwahrscheinlich, daß die Carboxylgruppe mit einer Aminosäure oder einem Peptid verknüpft ist.

Die hohe Wasserlöslichkeit der Verbindung, ihre ninhydrinpositive Reaktion und die Schwierigkeit, H-1 zu hydrolysieren, könnten durch das Vorliegen eines 2-Desoxy-2-Amino-Zucker-Esters erklärt werden, der wegen des elektrostatischen Einflusses der NH_3^+-Gruppe auf dem üblichen Wege nicht gespalten werden kann (BASCHANG, 1962).

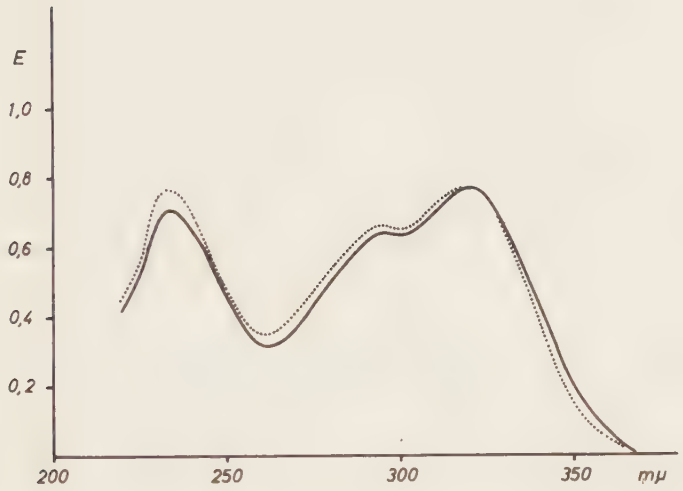
Abbildung 4



ausgezogene Kurve: Ferulasäure in 3 ml Äthylalkohol, 96%ig

punktierte Kurve: gleiche Lösung nach Zugabe von 1o mg N-Acetat in Subst.

Abbildung 5



ausgezogene Kurve: H-1 in 3 ml Äthanol, 96%ig

punktierte Kurve: gleiche Lösung nach Zugabe von 1o mg Na-Acetat in Subst.

Wir führten daher weitere Hydrolyseversuche mit Schwefelsäure in Gegenwart von Essigsäureanhydrid (Acetolyse) durch.

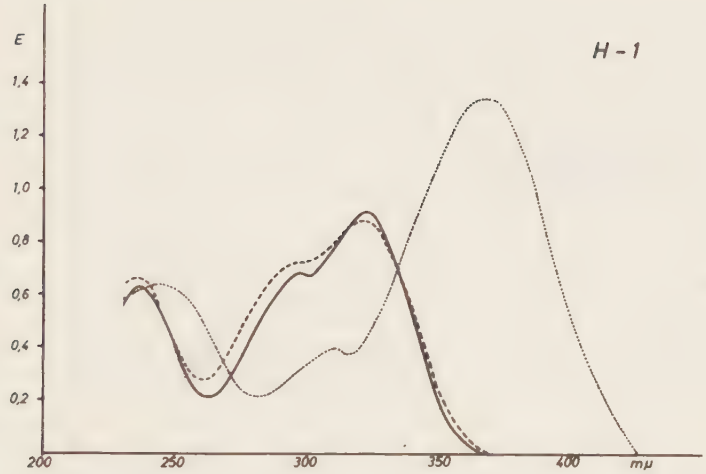
In einer Abänderung der von MASAMUNE et al. (1958) für die Spaltung von Mucopolysacchariden angegebenen Methode inkubierten wir entwässertes H-1 mit Essigsäureanhydrid, das 2% Schwefelsäure enthielt, 2 Tage bei 3o°C, entfernten die Schwefelsäure unter Eiskühlung mit $BaCl_2$ in wässriger Lösung und extrahierten mit Chloroform. Die Chloroform- wie auch die Wasserphase engten wir bis zur Trockne ein und hydrolysierten die acetylierten Spaltprodukte mit Methanol, das bei 0°C mit NH_3 gesättigt worden war, 6 Stunden bei Zimmertemperatur.

In der Chloroformphase konnten wir nach diesem Verfahren eindeutig Ferulasäure nachweisen, während wir nach Chromatographie der in der Wasserphase enthaltenen Spaltprodukte mit dem Partridge-Gemisch eine Verbindung erhielten, die nach Besprühen mit dem Anilin-Phthalatreagenz braun angefärbt wurde und den gleichen R_F-Wert besaß, wie eine im gleichen Chromatogramm mitchromatographierte Probe reines Glukosamins. Eine weitere Identifizierung dieses Spaltproduktes ließ sich jedoch nicht durchführen, da die angewendeten Hydrolysebedingungen zu hohen Substanzverlusten führten und da andererseits durch die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Isolierungsmethoden nur begrenzte Mengen an H-1 zur Verfügung standen. H-1 wäre demnach als ein Esterglykosid der Ferulasäure mit einem Aminozucker anzusehen.

Ein derartiger Verbindungstyp ist unseres Wissens bisher noch nicht beschrieben worden. Lediglich KÖTTER (1957) hat bei seinen Untersuchungen der Inhaltsstoffe von Kartoffeln einen Stoff gefunden, der eine gewisse Ähnlichkeit mit der von uns isolierten Verbindung H-1 zu haben schien. Um eine genaue Identifizierung der Substanzen durchführen zu können, extrahierten wir einige Knollen der mittelfrühen Kartoffelsorte "LORI" nach den Angaben von KÖTTER. Nach der chromatographischen Auftrennung der Inhaltsstoffe konnten wir in dem Extrakt eine Substanz nachweisen, die mit der von uns aus Tabakgewebe isolierten Verbindung H-1 identisch ist. KÖTTER vermutet in seiner Verbindung "b_2" einen Chlorogensäureverwandten, eine Ansicht, der wir uns nicht anschließen können, da die von uns mit KOH durchgeführten Hydrolyseversuche keine Spaltung der Verbindung ergaben und da sich keine o-Dihydroxygruppierung am Kern nachweisen ließ, Die von diesem Autor mit Phosphormolybdänsäure erhaltene Farbreaktion kann nicht als spezifisches Nachweismittel für o-Dihydroxyphenole angesehen werden, da auch Ferulasäure und p-Cumarsäure eine Reaktion geben, in Übereinstimmung mit RILEY (1950), daß auch einfache Phenole mit Phosphormolybdänsäure regieren.

Isolierungsschritte:
a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Wasser
c) Butanol/Eisessig/Wasser

UV-Spektrum:



ausgezogene Kurve: H-1 in 3 ml Äthanol, 96%ig

punktierte Kurve: gleiche Lösung nach Zugabe von 5o µl 1 n NaOH

unterbrochene Kurve: Ferulasäure

R_F-Werte:

Butanol/Essigsäure/Wasser	o,58 (trans)
	o,49 (cis)
Propanol/Ammoniak/Wasser	o,4o
Phosphatpuffer	o,53
	o,78
Wasser	o,o9
	o,24
Benzol/Essigsäure/Wasser	o,o2

Fluoreszenz-eigenschaft: schwach blau --> stark blaugrün

Farbreaktionen:

Reagenz	Anfärbung oder Änderung der Fluoreszenz
Folin-Ciocalteu	graublau
diazotierte Sulfanilsäure	rotbaun
Phosphormolybdänsäure	graublau
Fe^{+++}	grau
Benedicts Reagenz	Fluoreszenzverstärkung
$NaNO_2$	rosa
Na-Molybdat	keine Reaktion
Ninhydrin	schwach blauviolett

Fraktion F

Als günstigstes Fließmittel für die Reinigung der Fraktion F erwies sich Wasser. In einem Wasserchromatogramm wandert die Hauptmasse der Fraktion nur sehr wenig, so daß sich Verunreinigungen aus der Nachbarfraktion G sehr gut abtrennen lassen.

F-1

Die so gereinigte Fraktion F-1 ist in den folgenden beiden Punkten mit H-1 und J-3 verwandt: Sie stellt ein Zimtsäurederivat dar, das in einem Wasserchromatogramm praktisch nicht wandert und sie gibt mit Ninhydrin eine charakteristische blauviolette Färbung.

Das UV-Spektrum der Verbindung ist identisch mit dem reiner Kaffeesäure. Im alkalischen Medium ist F-1 unbeständig; das nach der Zugabe von NaOH beobachtete Absorptionsmaximum bei 366 mμ (bathochrome Verschiebung durch Phenolatbildung) ist bereits nach kurzer Zeit fast völlig verschwunden. Die ortho-Stellung der beiden freien phenolischen Hydroxyle wird durch die

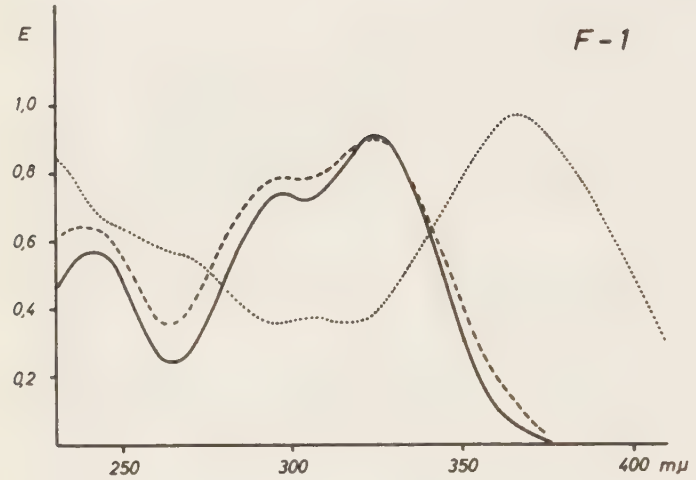
hierfür typischen Nachweisreaktionen bewiesen (s. Reaktionen 1 bis 3 der nachstehenden Tabelle).

Reagenz	Anfärbung oder Änderung der Fluoreszenz
BENEDICTs Reagenz	Fluoreszenzlöschung
Na-Molybdat	orangebraun
in NaOH	gelb
FOLIN-CIOCALTEU-Reagenz	graublau
diazotierte Sulfanilsäure	rotbraun
Fe^{+++}	grau

Wie bei Kaffeesäure und Chlorogensäure ist die Wanderungsgeschwindigkeit in einem Propanol/Ammoniak/Wasser-Chromatogramm stark herabgesetzt. Alle diese Eigenschaften lassen in Übereinstimmung mit dem UV-Spektrum in F-1 die H-1 analoge Verbindung der Kaffeesäure sehen.

Isolierungsschritte:
a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Wasser
c) Butanol/Eisessig/Wasser

UV-Spektrum:



ausgezogene Kurve: F-1 in 3 ml Äthanol, 96%ig

punktierte Kurve: gleiche Lösung nach Zugabe von 5o µl 1n NaOH

unterbrochene Kurve: Kaffeesäure

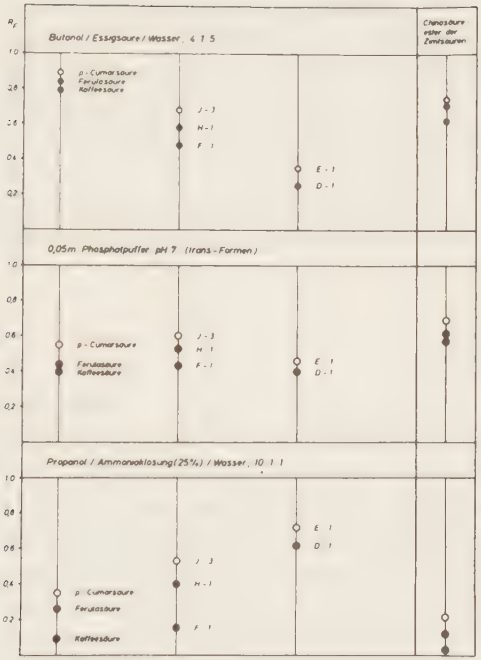
R_F-Werte:

Butanol/Eisessig/Wasser	o,48
Propanol/Ammoniak/Wasser	o,15
Phosphatpuffer	o,43
	o,63
Wasser	o,1o

Fluoreszenz-eigenschaft: schwach blau -> verstärkt blaugrün

Die Verwandtschaft der Verbindungen H-1, F-1 und J-3 - wobei letztere die der p-Cumarsäure analoge Verbindung darstellt - wird weiter durch den Vergleich der R_F-Werte der Verbindungen mit den R_F-Werten der entsprechenden Zimtsäuren und deren Chinasäureestern in verschiedenen Laufmitteln demonstriert (s. Abb. 7).

Abbildung 7



Zusammenhang zwischen R_F-Wert und Substitution für drei bekannte Zimtsäuren und deren Chinasäureester sowie für die unbekannten Verbindungen J-3, H-1, F-1, E-1 und D-1, für die entsprechende Kernsubstitutionen aus den UV-Spektren, Fluoreszenzeigenschaften u.ä. geschlossen wurden.

○ : Verbindungen mit p-Cumarsäurestruktur
● : Verbindungen mit Ferulasäurestruktur
◐ : Verbindungen mit Kaffeesäurestruktur

Der Vergleich zeigt, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der bekannten Zimtsäuren und ihrer Ester offensichtlich von dem Substitutionsmuster des aromatischen Kernes bestimmt wird, denn in den drei verschiedenen Laufmitteln wandert immer die p-Cumarsäure am schnellsten und die Kaffeesäure bzw. ihr Ester am langsamsten; dazwischen liegen die Ferulasäure bzw. ihr Ester. In diese Reihenfolge fügen sich nun die Verbindungen H-1, F-1 und J-3 sowie die beiden weiter unten noch zu besprechenden Verbindungen E-1 und D-1 gut ein. Auch hier wandert die Verbindung, für die wir einen Kern mit einer o-Dihydroxygruppierung erschlossen haben, langsamer als die Substanzen, für die wir eine Feruloyl- bzw. p-Cumaroylstruktur angenommen haben.

Fraktionen C, D und E

Die Fraktionen C, D und E erscheinen nach der Trennung eines Rohextraktes auf einem Butanol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm als schmale, scharf begrenzte Banden, die sich jedoch nach Elution und erneuter Chromatographie mit destilliertem Wasser in eine Hauptbande und in eine Reihe von schwächeren Nebenbanden auflösen. Da bei wiederholter Chromatographie der jeweiligen Hauptbande regelmäßig wieder die Nebenbanden auftreten, dürften diese wohl Kunstprodukte der instabilen Verbindungen C-1, D-1 und E-1 sein. Wir haben uns daher auf die Untersuchungen der Hauptkomponenten beschränkt, die jedoch durch die Instabilität der Verbindungen sehr erschwert war. So gelang es zum Beispiel nicht, genügend reines Material für die Aufnahme eines UV-Spektrums der Verbindung C-1 zu erhalten.

C-1

C-1 besitzt in einem Butanol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm einen niedrigen R_F-Wert, der auf eine gute Wasserlöslichkeit der Verbindung deutet. Diese tritt jedoch in einem Wasserchromatogramm nicht in Erscheinung, so daß man annehmen muß, daß sich die Verbindung hier nach den Gesetzen der Adsorptionschromatographie verteilt und eine starke Affinität zur Cellulose besitzt (HAIS-MACEK, 1958, Bd. 1, Seiten 58 und 63) (ROBERTS & WOOD, 1953).

Bedampfen mit Ammoniak oder Besprühen mit BENEDICTs Reagenz verstärkt die Fluoreszenz, ein Hinweis auf eine freie phenolische Hydroxylgruppe in der Verbindung. Eine Anfärbung mit Ninhydrin wurde nicht beobachtet.

Isolierungsschritte:
a) Butanol/Essigsäure/Wasser
b) Wasser
c) Butanol/Eisessig/Wasser

R_F-Werte:
Butanol/Eisessig/Wasser.....o,2o
Phosphatpuffer.....o,17
Wasser.....o,o6

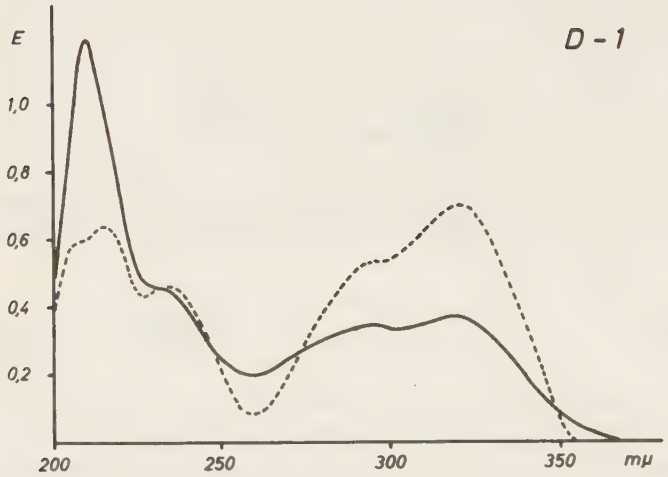
Fluoreszenz-eigenschaft:
blaugrün -> verstärkt blaugrün

D-1

Die Verbindung liegt in einem Phosphatpufferchromatograumm in der cis- und trans-Form vor. Wie die Verbindung C-1 wandert auch D-1 praktisch nicht in einem Wasserschromatogramm und färbt sich mit Ninhydrin nicht an. Die folgenden Eigenschaften deuten das Vorliegen einer Feruloylstruktur in der Verbindung D-1 an: Das UV-Spektrum zeigt die für Ferulasäure typischen Maxima bzw. Schultern um 32o, 295, 235 und31o mμ und Minima bei 248 mμ. Die Fluoreszenz wird durch Bedampfen mit Ammoniak oder durch Besprühen mit BENEDICTs Reagenz in der für Ferulasäure typischen Weise vertieft.

Isolierungsschritte:
a) Butanol/Eisessig/Wasser
b) Wasser
c) Butanol/Eisessig/Wasser

UV-Spektrum:



Unterbrochene Kurve: Ferulasäure
Lösungsmittel: Äthanol, 80%ig

R_F-Werte:

Butanol/Eisessig/Wasser	0,25
Propanol/Ammoniak/Wasser	0,62
Phosphatpuffer	0,40
	0,73
Wasser	0,03

Fluoreszenz-eigenschaft: blaugrün -> verstärkt blaugrün

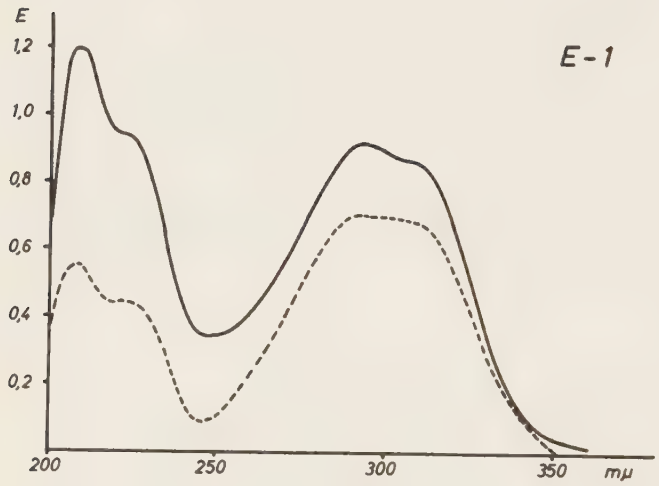
E-1

So wie die Eigenschaften der Verbindung D-1 den Schluß auf eine Feruloylstruktur nahelegen, weisen die für E-1 ermittelten Daten auf das Vorliegen eines p-Cumaroylgerüstet hin. Die UV-Spektren von E-1 und p-Cumarsäure zeigen eine gute Übereinstimmung, zum anderen wird E-1 wie die p-Cumarsäure und deren Ester erst nach dem Bedampfen mit Ammoniak in dunkelblauer Fluoreszenz sichtbar.

Die geringe Wanderung in einem Wasserchromatogramm schließt wie im Fall der Verbindung D-1 das Vorliegen freier Säuren aus und reiht E-1 in die Gruppe der Stoffe ein, die in wässriger Lösung eine große Neigung zur Adsorption an die Cellulosefaser besitzen. Mit Ninhydrin ist eine schwach positive Reaktion zu beobachten. Auffällig ist die Abnahme der Fluoreszenz von E-1 bei Bestrahlung mit einer UV-Lampe. Die Abnahme ist reversibel. Werden die Lösungen nach der UV-Bestrahlung einige Stunden bei Tageslicht gehalten, so beobachtet man wieder die ursprüngliche Fluoreszenzintensität. Wahrscheinlich ist dies Verhalten auf eine Verschiebung des cis- und trans-Gleichgewichtes im UV zu Gunsten der nicht fluoreszierenden cis-Form zurückzuführen, das im Tageslicht wieder in das ursprüngliche Verhältnis zurückkehrt.

Isolierungsschritte:	a) Butanol/Eisessig/Wasser b) Wasser c) Butanol/Eisessig/Wasser
R_F-Werte:	Butanol/Eisessig/Wasser.....o,35 Propanol/Ammoniak/Wasser....o,72 Phosphatpuffer.....o,46 o,58 Wasser.....o,o5
Fluoreszenz-eigenschaft:	keine Fluoreszenz -> dunkelblau

UV-Spektrum:



Unterbrochene Kurve: p-Cumarsäure
Lösungsmittel: Äthanol, 96%ig

Die Fülle der in den vorliegenden Versuchen aufgefundenen Phenylpropankörper zeigt einen reger. Zimtsäurestoffwechsel unserer Gewebekulturen an, dessen Intensität besonders klar bei einem Vergleich der aus den Gewebekulturen und aus Teilen ganzer Pflanzen extrahierbaren Mengen einzelner Komponenten des Phenylpropanstoffwechsels hervortritt. In Tabelle 1 sind die aus Blättern verschiedenen Alters und Wurzeln von 6 Monate alten Samsunpflanzen nach Hydrolyse von Acetonrohextrakten erhaltenen Scopoletinmengen mit den aus Gewebekulturen gewonnenen Mengen zusammengestellt, wobei der höhere Scopoletingehalt der Gewebekulturen deutlich erkennbar ist.

Die Messungen erfolgten nach chromatographischer Reinigung durch Bestimmung der relativen Fluoreszenzhelligkeit gegen einen Chininsulfatstandart (1mg Chininsulfat in 1 l o,1n H_2SO_4). Vor den Messungen mit dem Zeiß-Spektralphotometer QII mit Fluoreszenzansatz ZFM 4 (Messung der Fluoreszenz bei 460 mμ, anregende Wellenlänge 365 mμ) versetzten wir je 3 ml äthanolischer Lösung (ca. o,o3 γ/ml) mit o,1 ml 1n NaOH.

	μg Scopoletin	
	pro mg N	pro g FG
junge, nicht voll entwickelte Blätter der terminalen Sproßknospe	o,oo	o,oo
voll entwickelte grüne Blätter aus der mittleren Sproßregion	o,o3	o,o4
gelbe "Sandblätter"	o,1o	o,o9
Wurzel	25,oo	6,25
Gewebekultur, 27 Tage alt	1o9,5o	31,oo

Tabelle 1

Scopoletingehalt von Blatt und Wurzel einer 6 Monate alten nicht blühenden Pflanze sowie einer Gewebekultur von Nicotiana tabacum var. Samsun.

Der intensive Phenylpropanstoffwechsel der Gewebe, dessen Ursache in der reichlichen Kohlenhydratversorgung der Kulturen zu suchen sein dürfte, läßt es aussichtsreich erscheinen, den biogenetischen Zusammenhang der aufgefundenen bekannten Verbindungen näher zu untersuchen und die Funktion der noch nicht eindeutig identifizierten Verbindungen im Stoffwechsel der Gewebe zu analysieren, da man annehmen kann, daß der intensive Phenylpropanstoffwechsel sowohl eine Erhöhung einzelner Enzymaktivitäten wie auch eine Anhebung des Spiegels von Intermediärprodukten mit sich bringt.

Wir haben uns daher im zweiten Teil der Arbeit auf zwei Wegen bemüht, einen Zusammenhang der von uns aufgefundenen Verbindungen nachzuweisen. Wir haben einmal versucht, durch Enzymversuche in vitro mit aus den Geweben gewonnenen Enympräparaten die Umwandlung einzelner Verbindungen in mutmaßliche Folgeprodukte zu erreichen und wir haben ferner versucht, durch Markierungsversuche Anhaltspunkte für die Reihenfolge der einzelnen Verbindungen zu gewinnen.

2. Enzymatische Versuche.

a) Versuche zur Biosynthese der Chlorogensäure.

Im Rahmen der Identifizierung der in den Gewebekulturen vorkommenden Zimtsäurederivate haben wir die 3-O-p-Cumaroylchinasäure nachweisen können, die nach LEVY & ZUCKER (1960) in der Kartoffel ein Zwischenprodukt der Chlorogensäuresynthese ist. Die Verwandtschaft von SOLANUM TUBEROSUM und NICOTIANA TABACUM legt die Vermutung nahe, daß die Cumaroylchinasäure auch in unseren Geweben eine Vorstufe der Chlorogensäure bildet. Wir haben daher geprüft, ob sich der aus unseren Geweben isolierte p-Cumarsäure-Chinasäure-Ester in vitro zu Chlorogensäure oxydieren und sich das hierzu notwendige Enzym aus unseren Geweben isolieren läßt. Wir benutzten ein Enzympräparat, das wir durch Ammonsulfatfällung aus dem wässrigen Überstand von Gewebehomogenaten erhalten und durch Dialyse gereinigt hatten.

Ca. 300 g (FG) Gewebe 20 Tage alter Agarkulturen wurden in 100 ml 0,2 m Phosphatpuffer, pH 7, suspendiert, auf 0°C abgekühlt und im Eisbad 10 Minuten mit dem ULTRA-TURRAX zertrümmert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Rückstand in weiteren 100 ml 0,05 m Phosphatpuffer, pH 7, aufgenommen, nochmals 5 min der Behandlung mit dem ULTRA-TURRAX unterworfen und zentrifugiert. In den vereinigten Extrakten (250 ml) wurden 30 g Ammoniumsulfat gelöst und der entstandene Niederschlag nach 10 min abzentrifugiert und verworfen. Dem Überstand wurden dann innerhalb von 3 Stunden 95 g Ammoniumsulfat in Portionen zu ca. 3 g zugefügt. Der anschließend abzentrifugierte Niederschlag wurde in 20 ml 0,05 m Phosphatpuffer, pH 7, suspendiert und die Suspension 12 Stunden gegen fließendes Wasser sowie 24 Stunden gegen 3 x 5 Liter 0,005 m Phosphatpuffer, pH 7, dialysiert. In dem von den ungelösten Partikeln abfiltrierten Dialysat ließen sich keine fluoreszierenden Stoffe mehr nachweisen. Alle Arbeiten wurden in einem Kälteraum bei 4°C ausgeführt. Die im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrte Enzymlösung zeigte noch nach einigen Wochen keinen Abfall der Phenolaseaktivität.

Mit diesem Enzymgemisch wurde die aus den Geweben isolierte und papierchromatographisch gereinigte Cumaroylchinasäure in Gegenwart von Na-Ascorbat 60 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Na-Ascorbat sollte dabei eine weitere Oxydation der entstehenden Chlorogensäure verhindern. Die Inkubationsansätze enthielten im einzelnen folgende Mengen:

5o µl Trispuffer, pH 8,3.....o,2 molar
5o µl Na-Ascorbat.....o,2 molar
5o µl Cumaroylchinasäure.....ca. 5 x $1o^{-4}$ molar
1oo µl Enzymlösung

Nach der Inkubation wurde das Enzym mit 75o µl Aceton gefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde eingeengt und in einem Butanol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm zusammen mit Vergleichssubstanzen chromatographiert. Die entstandene Chlorogensäure konnte auf den Chromatogrammen eindeutig durch ihre mit der Vergleichssubstanz übereinstimmende Lage und ihre charakteristische Fluoreszenz nachgewiesen werden. Nach Aufkochen der Enzymlösung wurde keine Chlorogensäure aus der Cumaroylchinasäure gebildet. Die nähere Untersuchung wies das wirksame Enzym als eine Phenolase aus. Da uns nicht genügend p-Cumarsäure-Chinasäureester zur Verfügung stand, benutzten wir für die Charakterisierung des Enzyms die Oxydation von reiner p-Cumarsäure zu Kaffeesäure als Modellreaktion und wählten als Maß für die Enzymaktivität die bei der Oxydation in der Zeiteinheit verbrauchte O_2-Menge, die im manometrischen Versuch gemessen wurde. Wie Abbildung 8a zeigt, liegt das pH-Optimum unseres Enzyms aus Tabakgewebe in Trispuffer bei pH 8,3 und deckt sich mit dem von LEVY & ZUCKER angegebenen Optimum für das in der Kartoffel wirksame Enzym.

Der Verlauf der Oxydation zeigt eine längere Induktionsperiode, die charakteristisch für viele bisher untersuchten Phenolasen ist (KERTESZ & ZITO, 1962; FREY-WYSSLING & SZARKOWSKI, 1959; KARKHANIS & FRIEDEN, 1961) (Abbildung 8b, Kurve 2). Die in einer Reihe anderer Fälle beschriebene Erhöhung der Phenolaseaktivität durch Ascorbinsäure (KERTESZ & ZITO, 1962; KOVACS, 1962) (Abbildung 8b, Kurve 1) konnten wir ebenfalls in unseren Versuchen bestätigen. In Gegenwart von $1o^{-2}$ Mol Ascorbinsäure steigt der O_2-Verbrauch um über 12o%, die Induktionsperiode verschwindet und es folgt eine frühe Inaktivierung des Reaktionssystems, die dies von ROLLAND und LISSITZKY (1962) für die Oxydation des Tyrosins in Gegenwart von Ascorbinsäure beschrieben worden ist. Durch 2 x $1o^{-6}$ m Natriumdiäthyldithiocarbamat, einen für kupferhaltige Enzyme spezifischen Hemmstoff, wird die Reaktion nahezu vollständig gehemmt (Abbildung 8b, Kurve 3).

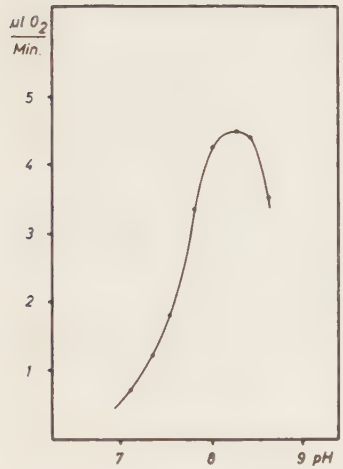


Abbildung 8a

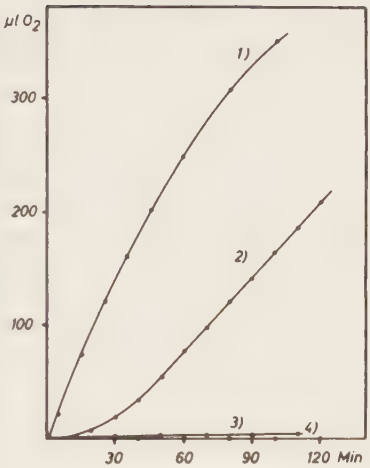


Abbildung 8b

Abbildung 8a

Oxydation von p-Cumarsäure durch eine Phenolase aus NICOTIANA-TABACUM-Geweben in Abhängigkeit vom pH des Inkubationsgemisches.

Inkubationsansatz: o,4 ml p-Cumarsäure, o,o8 m; o,6 ml Wasser, 1,8 ml Trispuffer, o,o5 m; o,4 ml Enzymlösung.

Abbildung 8b:

Oxydation von p-Cumarsäure durch eine Phenolase aus NICOTIANA-TABACUM-Geweben in Abhängigkeit von der Zeit.

Inkubationsansätze:
Kurve 1: o,4 ml p-Cumarsäure, o,o8 m, pH 7; o,6 ml Na-Ascorbat o,o5 m; 1,8 ml Trispuffer, o,o5 m, pH 8,3; o,4 ml Enzymlösung.
Kurve 2: o,4 ml p-Cumarsäure, o,o8 m, pH 7; o,6 ml Wasser; 1,8 ml Trispuffer, o,o5 m, pH 8,3; o,4 ml Enzymlösung.
Kurve 3: o,4 ml p-Cumarsäure, o,o8 m, pH 7; o,6 ml Na-Diäthyldithiocarbamat, 10^{-5} m; 1,8 ml Trispuffer, o,o5 m, pH 8,3; o,4 ml Enzymlösung.
Kurve 4: o,4 ml p-Cumarsäure, o,o8 m, pH 7; o,6 ml Wasser; 1,8 ml Trispuffer o,o5 m, pH 8,3; o,4 ml Enzymlösung, 1 min gekocht.

b) Versuche zur Biosynthese des Scopoletins.

Neben der Chlorogensäure wird in unseren Geweben Scopoletin in größeren Mengen gebildet, das entweder als Glukosid Scopolin oder als Aglykon vorliegt. Die Biogenese dieses substituierten Cumarins ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Da Scopoletin das Lacton der Ferulasäure ist, wird einmal die Möglichkeit diskutiert (BEST 1948), daß seine Bildung über eine in o-Stellung zur Seitenkette hydroxylierte Ferulasäure und einen normalen Lactonringschluß unter Wasserabspaltung erfolgt. Nach HAWORTH (1961) könnte der Lactonring aber auch über eine chinoide Zwischenstufe entstehen. Im ersten Fall wäre für die Bildung der 2-OH-Ferulasäure eine spezifische Hydroxylase zu fordern, während im zweiten Fall eine Laccase die Ferulasäure analog dem Angriff auf den Coniferylalkohol in ein Chinonradikal umwandelt (FREUDENBERG 1962):

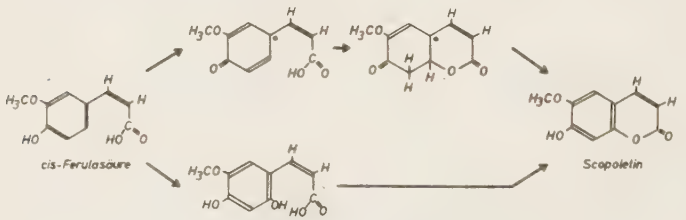


Abbildung 9:
Hypothetische Biosynthesewege des Scopoletins (vgl. Text)

Da sich in unseren Geweben eine Laccase nachweisen läßt, haben wir geprüft, ob es mit dieser gelingt, Ferulasäure in Scopoletin umzuwandeln, Hierzu inkubierten wir neutralisierte und durch UV-Bestrahlung der trans-Form mit einem Enzympräparat (Darstellung siehe Seite 59) in Phosphatpuffer. In den nach verschiedenen Zeiten den Inkubationsansätzen entnommenen Proben fand sich bereits nach wenigen Minuten eine grün fluoreszierende Substanz, die in einem Butanol/Eisessig/Wasser-Chromatogramm einen R_F-Wert von o,9o besaß. In keinem Fall konnten wir jedoch blau fluoreszierendes Scopoletin

(R_F= o,83) nachweisen. Da wir die grün fluoreszierende Verbindung auch durch Oxydation von Ferulasäure mit $FeCl_3$ erhalten konnten, vermuten wir in ihr die Dehydrodiferulasäure, die bereits von CARTWRIGHT und HAWORTH (1944) nach dem Einwirken von $FeCl_3$ auf Ferulasäure isoliert worden ist und deren Eigenschaften sich mit der von uns auf enzymatischem Wege erhaltenen Substanz decken.

In den Versuchen von REZNIK und URBAN (1957) zur Bildung von Scopoletin fand sich nach der Fütterung markierter Ferulasäure auch markierte Kaffeesäure. Dies legt die Möglichkeit nahe, daß zunächst das Lacton der Kaffeesäure (Äsculetin) gebildet und dieses dann zum Scopoletin methyliert wird.

Da sich die Kaffeesäure mit Phenolase leicht zu ihrem o-Chinon oxydieren läßt, haben wir versucht, die enzymatische Bildung von Scopoletin in zwei Schritten über Kaffeesäure zu erreichen. Im ersten Reaktionsschritt inkubierten wir 5o µl einer o,o2%igen Kaffeesäurelösung, in der wir zuvor durch Bestrahlen mit UV-Licht die cis-Form angereichert hatten, mit 5o µl der bereits für die Oxydation der p-Cumarsäure benutzten Enzymlösung in Phosphat- und Phosphat-Citratpuffer von verschiedenem pH. Nach einer Inkubationszeit von 5 Min. unterbrachen wir die Oxydation der Kaffeesäure durch Zugabe von 1o µl einer 1%igen Ascorbinsäurelösung und chromatographierten die einzelnen Proben mit o,o5 m Phosphatpuffer vom pH 7. Auf den Chromatogrammen fand sich bei R_F = o,3o eine neue, blau fluoreszierende Verbindung, die wir nach Chromatographie der Fleckeneluate in verschiedenen Lösungsmitteln mit reinen Testsubstanzen als Äsculetin identifizieren konnten. Unter unseren Versuchsbedingungen erfolgte die optimale Bildung von Äsculetin bei einem pH von 3,5. Da das Äsculetin weiterhin dem Angriff der in dem Enzympräparat enthaltenen Phenolase ausgesetzt ist, ist eine genaue quantitative Bestimmung des gebildeten Äsculetins praktisch nicht durchführbar. Ein Zusatz von Reduktionsmitteln verhindert nicht nur die weitere Oxydation des Äsculetins, sondern stoppt auch dessen Bildung, da in Gegenwart eines Reduktionsmittels wie etwa Ascorbinsäure in dem Inkubationsgemisch praktisch kein Chinon der Kaffeesäure mehr vorliegt.

Da somit die Bildung von Äsculetin in unseren Geweben möglich ist, wurde in einer zweiten Versuchsserie versucht, Äsculetin mit S-Adenosylmethionin zu methylieren.

Hierzu inkubierten wir das Substrat mit S-Adenosylmethionin und $MgCl_2$ unter Bedingungen, wie sie von AXELROD & TOMCHIK (1958) für die Methylierung einer Reihe von o-Di-Hydroxyphenolen und von FINKLE & NELSON (1963) für die Methylierung von Kaffeesäure zu Ferulasäure eingehalten worden sind. wegen der Gefahr der Oxydation des Äsculetins durch die in unserem Enzymgemisch anwesende Phenolase inkubierten wir unter Stickstoffatmosphäre.

Es gelang uns jedoch nicht, den sicheren Nachweis einer Methylierung des Äsculetins zu führen. Auch die unter gleichen Bedingungen als Substrat verwendete Kaffeesäure konnte nicht in Ferulasäure umgewandelt werden.

3. Fütterungsversuche mit Phenylalanin-C-14.

Füttert man eine Suspension junger, wachsender Zellen von NICOTIANA TABACUM mit L-Phenylalanin-C-14 (U) und entnimmt der Suspension zu verschiedenen Zeiten Proben, so lassen sich die Phenylalaninaufnahme und -Umwandlung im Stoffwechsel der Zellen verfolgen, wobei die Verwendung von Zellsuspensionen einmal eine einheitliche Probeentnahme während des Versuches gewährleistet und zum anderen durch die sehr günstigen Bedingungen für die Stoffaufnahme relativ kurze Inkubationszeiten ermöglicht. Abbildung 1o gibt den Phenylalaningehalt und die Gesamtmarkierung von Tabakzellen wieder, die als Suspension in dem WHITEschen Grundmedium mit 4 µc Phenylalanin-C-14 inkubiert wurden.

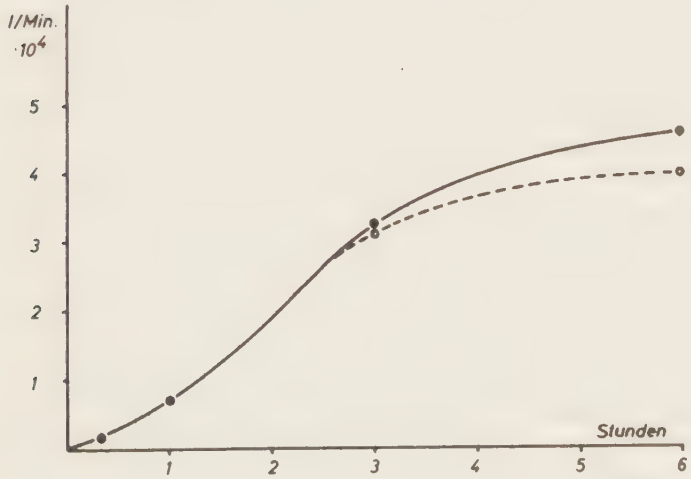


Abbildung 1o:

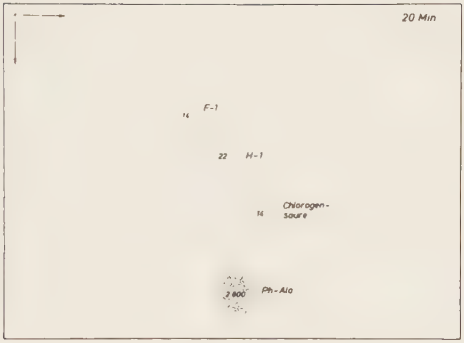
Phenylalanin-C-14-(U)-Aufnahme einer SAMSUN-Suspension

———— : Gesamtaktivität eines Acetonextraktes

- - - - - - - - - - - - : Aktivität des eingelagerten, noch unverarbeiteten Phenylalanin-C-14

Die Phenylalaninaufnahme der Zellen zeigt nach einer kurzen Verzögerung einen steilen Anstieg zwischen der ersten und dritten Stunde und fällt dann wieder ab, da der Gehalt der Zellen offenbar einen Sättigungswert erreicht. Mit dem steigenden Gehalt der Zellen an Phenylalanin nimmt auch die Menge an markierten Phenylpropanen in den Zellen zu, was sich an der zunehmenden Differenz zwischen der Gesamtaktivität des Acetonextraktes und dem hierin enthaltenen Phenylalanin-C-14 spiegelt.

Die ersten markierten Phenylpropanderivate sind bereits nach 2ominütiger Inkubation auf den Radioautogrammen nachweisbar. Wie die Abbildung 11a zeigt, handelt es sich um Chlorogensäure und die als H-1 und F-1 bezeichneten Verbindungen. Zu diesen kommen nach 6o Minuten Inkubationszeit die Verbindungen E-1 und p-Hydroxyphenylmilchsäure hinzu. Nach drei bzw. sechs Stunden enthalten die Radioautogramme schon eine so große Zahl von markierten Verbindungen, daß es nicht mehr möglich ist, Aussagen über die Reihenfolge des Auftretens der einzelnen Komponenten zu machen. Von den nach sechsstündiger Inkubation in den Extrakten enthaltenen Verbindungen (s. Abbildungen 11d und 12a,b) ließen sich nach Elution der auf den Radioautogrammen erscheinenden Flecken und Chromatographie der Eluate mit Vergleichssubstanzen die Verbindungen D-1, E-1 F-1, H-1, Scopolin und Chlorogensäure (cis- und trans-Form) sowie p-Cumaroylglukose, p-Cumarsäure, p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und p-Hydroxyphenylmilchsäure identifizieren. Die Flecken (4) und (6) dürften auf Grund ihrer Lage auf den Chromatogrammen der Kaffeesäure bzw. der Ferulasäure zuzuordnen sein. Von den übrigen markierten Verbindungen interessierten im Zusammenhang mit unseren Fragestellungen die durch hohe R_F-Werte in der ersten Laufrichtung ausgezeichneten Flecken (2), (3), (5) und (11). Ihre geringen Aktivitäten ließen eine eindeutige Identifizierung nicht zu. Wir konnten jedoch nachweisen, daß keine dieser Verbindungen mit Phenylbrenztraubensäure, Phenylmilchsäure, Zimtsäure, Coniferylalkohol oder Coniferin identisch war. Auffällig ist, daß die ersten faßbaren markierten Produkte Substanzen sind, die nicht in einem Reaktionsschritt aus dem Phenylalanin entstanden sein können: F-1 besitzt ebenso wie der Kaffeesäureanteil der Chlorogensäure zwei aromatische Hydroxylgruppen und der aromatische Kern von H-1 entspricht, wie wir oben gezeigt haben, der Ferulasäure. Beide Verbindungen


20 Min
F-1
14
22 H-1
14 Chlorogen-
saure
2 800 Ph-Ala

11a

60 Min.
27 F-1
27
E-1
77 H-1
90 Chlorogen-
saure
13
p-OH-Ph-MS
6 750 Ph-Ala

11b

180 Min
F-1
44
D-1
58
E-1
73
H-1
345
p-Cumar-
saure
54
Chlorogen-
saure
270
(8)
(1)
55
70
74
(9)
38
53
p-Cumaroyl-
Chinasaure
30
110
Ph-Ala
93

11c

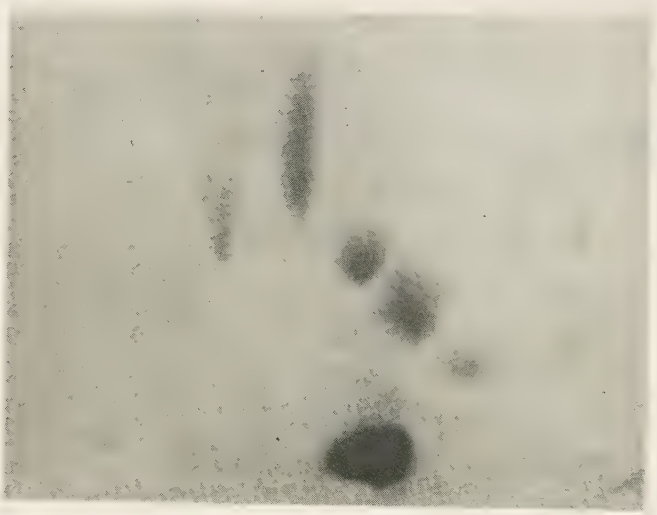
360 Min
D-1
176
1250
F-1
(4)
100
(6)
58
700
E-1
(3)
H-1
180
p-Cumar-
Saure
1130
750
Chlorogen-
saure
1240
p-Cumars.-
Glukoseester
(5)
(2)
140
140
(1)
Scopolin
370
(11)
76
(12)
53
220
(8)
63
35
Ph-Ala
33
300
(9)
60
110
88

11d

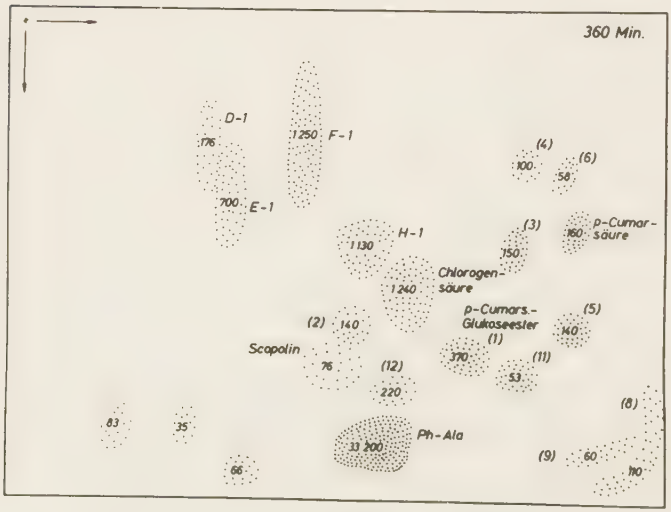
Abbildungen 11a bis 11d

Radioautogramme von Acetonrohextrakten aus NICOTIANA-TABACUM-Geweben, die während 2o, 6o, 18o und 36o min mit Phenylalanin-C-14 gefüttert wurden.

Laufmittelgemische und Bezeichnung der Verbindungen wie in Abb. 12b, Zahlenangaben in den Flecken: Aktivität der Flecken in I/min.



12a


360 Min.
D-1
176
1250 F-1
700 E-1
(4)
100
(6)
58
(3)
160 p-Cumar-
säure
150
H-1
1130
Chlorogen-
säure
1240
p-Cumars.-
Glukoseester
(5)
140
(2)
140
(1)
Scopolin
370
(11)
76
(12)
53
220
(8)
83
35
Ph-Ala
33 200
(9)
60
110
66

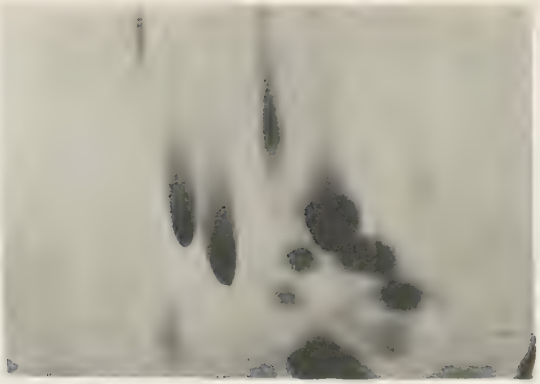
12b

Abbildung 12a:

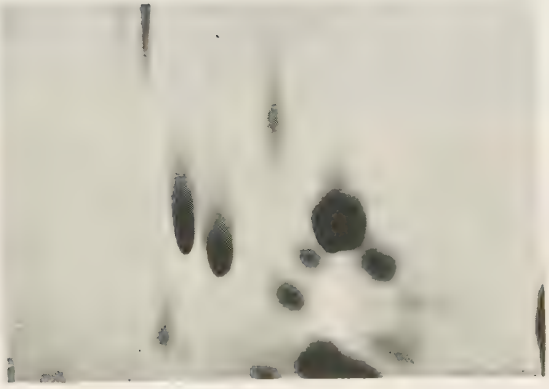
Radioautogramm eines Acetonextraktes aus NICOTIANA-TABACUM-Gewebe, das 360 min lang mit Phenylalanin-C-14 gefüttert wurde.

Abbildung 12b:

Schematische Zeichnung des gleichen Radioautogrammes. Ausgezogene Linien deuten Verbindungen an, deren Fluoreszenz auf dem Chromatogramm beobachtet werden konnte; Punktierungen bezeichnen die Lage strahlender Substanzen: (1) = p-Cumaroylglukoseester; (4) = Kaffeesäure; (6) = Ferulasäure; (8) = p-Hydroxy-Phenyl-Milchsäure; (9) = p-Hydroxy-Phenyl-Brenztraubensäure; (12) = cis-Chlorogensäure; (2), (3), (5) und (11) = unbekannte Verbindungen.



13a

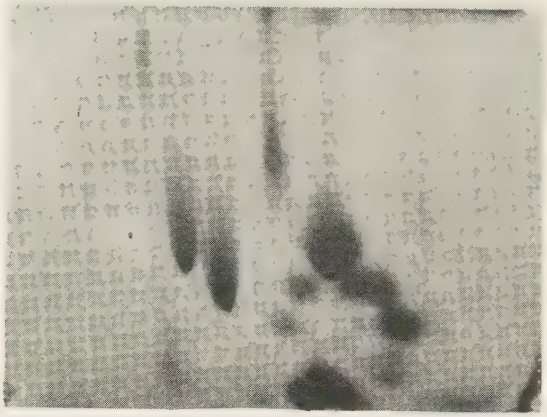


13b

13c

Abbildungen 13a bis 13c:

Radioautogramme von Acetonextrakten aus NICOTIANA-TABACUM-Geweben, die 24 (Abb. 13a), 48 (Abb. 13b) und 192 Stunden (Abb. 13c) mit Phenylalanin-C-14 gefüttert wurden. Laufmittelgemische wie in Abb. 12b.



14a

1) Butanol / Essig- : säure / Wasser, 4:1:5
2) 0,5 m Phosphatpuffer pH 7
C-1
F-1
Scopoletin
(6)
p-Cumar-säure (7)
(3)
Ch-1 trans
Chlorogensäure
J-3
D-1
E-1
(2)
(5)
(13)
(1)
(11)
Scopolin
(12)
(14)
H-1
(10)
(8) p-OH-Phenyl-milchsäure
(9) p-OH-Phenyl-BTS
Phenyl-alanin

14b

Abbildung 14a:

Radioautogramm eines Acetonextraktes aus NICOTIANA-TABACUM-Gewebe, das 24 Stunden lang mit Phenylalanin-C-14 gefüttert wurde.

Abbildung 14b:

Schematische Zeichnung des gleichen Radioautogrammes. Ausgezogene Linien deuten Verbindungen an, deren Fluoreszenz auf dem Chromatogramm beobachtet werden konnte; Punktierungen bezeichnen die Lage strahlender Substanzen: (1) = p-Cumarsäure-Glukose-Ester; (6) = Ferulasäure; (12) = cis-Chlorogensäure; (13) = cis-J-3; (14) = cis-p-Cumarsäure-Glukose-Ester; (2), (3), (5), (1o) und (11) = unbekannte Verbindungen.

enthalten zudem in der Seitenkette eine Doppelbindung. Die theoretisch zwischen diesen und dem Phenylalanin liegenden Intermediärprodukte Phenylmilchsäure, p-Hydroxyphenylmilchsäure usw. finden sich jedoch erst wesentlich später in den Zellen. Dies kann entweder heißen, daß die Biogenese von H-1 und F-1 nicht über diese Verbindungen erfolgt oder daß die Reaktionsgeschwindigkeiten und die hieraus resultierenden Poolgrößen so ungünstig liegen, daß die zeitliche Reihenfolge des Auftretens der einzelnen markierten Verbindungen nicht die Reihenfolge der chemischen Reaktionsschritte widerspiegelt.

Es ist daher nicht möglich, in dem vorliegenden System durch Kurzzeitversuche Aufschlüsse über die Biosynthesewege der hier interessierenden Phenylpropankörper zu erlangen.

In einer zweiten Versuchsserie inkubierten wir Zellsuspensionen mit 3 µc Phenylalanin und entnahmen Proben nach 24, 48 und 192 Stunden (s. Abbildungen 13a,b,c und 14a,b). Wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, nimmt der Gehalt der Zellen an freiem Phenylalanin bereits nach dem ersten Tag stark ab. Das nach 24stündiger Inkubation in den Zellen enthaltene freie Phenylalanin mit 14 66o I/min ist nach weiteren 24 Stunden auf 5 5oo I/min und nach 192 Stunden auf 2 47o I min, d.h. auf 17% des 24-Stundenwertes gefallen. Mit diesem Auslaufen des Phenylalaninpools in den Zellen erfolgen Veränderungen in den Poolgrößen der übrigen Verbindungen, die Rückschlüsse auf die biogenetische Verwandtschaft einzelner Produkte zu ziehen erlauben. Die auffälligsten Veränderungen erfolgen in dem Gehalt der Verbindungen J-3, F-1, H-1, D-1 und C-1. Während der Gehalt an Phenylalanin zwischen der 24. und der 192. Stunde um 83% fällt, nimmt die Markierung von C-1 im gleichen Zeitraum von 27o I/min auf 54o I/min, d.h. um 1oo%, zu. Eine nicht ganz so markante, aber eindeutige Zunahme zeigt auch die Impulszahl von D-1, die um rund 5o% von 1 41o I/min auf 2 o7o I/min steigt.

Die Impulsrate von H-1 zeigt nur einen geringen Abfall um 3o% des Ausgangswertes, während der Abfall von F-1, J-3 und E-1 4o%, 65% und 78% beträgt.

Fütterungs-dauer (Stunden)	Phe	J-3	F-1	H-1	D-1	C-1
24	14 660 ≙100%	1 260 ≙100%	580 ≙100%	8 880 ≙100%	1 410 ≙100%	270 ≙100%
48	5 500 ≙38%	1 000 ≙71%	450 ≙78%	8 010 ≙90%	1 730 ≙123%	410 ≙152%
192	2 470 ≙17%	440 ≙35%	330 ≙60%	6 210 ≙70%	2 070 ≙147%	540 ≙200%

Fütterungs-dauer (Stunden)	E-1
24	2 090 ≙100%
48	1 260 ≙60%
192	570 ≙22%

Tabelle 2

Die Verteilung der Radioaktivität auf die Verbindungen Phenylalanin, J-3, F-1, D-1, C-1 und E-1 nach verschiedenen Fütterungszeiten.

Gemessen wurde die Aktivität der in den Abbildungen 13a bis 13c durch Autoradiographie sichtbar gemachten Flecken (Zahlenangaben in I/min).

Diese Veränderungen in den Markierungsintensitäten kann man mit der Annahme erklären, daß die genannten Verbindungen Glieder einer Reaktionskette sind, durch die Phenylalanin in C-1 umgewandelt wird. Ein Absinken des Phenylalaninangebotes würde dann als erstes ein Sinken des Spiegels der ersten Glieder der Kette zur Folge haben, während die am Ende stehenden Glieder in ihrer Menge noch zunehmen. Man müßte demnach fordern, daß J-3 eine Vorstufe von F-1 und dieses eine Vorstufe von H-1 ist, während D-1 und C-1 aus H-1 gebildet werden. Diese Annahme ist zum Teil einer experimentellen Prüfung zugänglich, da sich in den Zellen größere Mengen von H-1 finden, die isoliert und wieder an Zellen verfüttert werden können. Tabelle 3 gibt das Ergebnis der Wiederverfütterung von H-1 wieder.

Aktivität des Mediums:		
vor der Fütterung:	27 74o I/Min.	= 1oo,o %
nach der Fütterung:	12 86o I/Min.	= 46,5 %
Aktivität des Gewebes:		
acetonlösliche Anteile:	1 18o I/Min.	= 8,5 %
acetonunlösliche Anteile:	12 69o I/Min.	= 91,5 %
	13 87o I/Min.	= 1oo,o %
Aktivität des acetonunlöslichen Anteils:		
Rückstand nach Hydrolyse:	5 1oo I/Min.	= 52 %
Hydrolysat:	4 64o I/Min.	= 48 %
	9 74o I/Min.	= 1oo %

Tabelle 3

Durch Fütterung von 5 µc Phenylalanin erhielten wir markiertes H-1 mit einer Gesamtaktivität von 27 74o I/Min. Nach 36 Stunden Fütterung waren 53,5% des angebotenen H-1 von den Zellen aufgenommen worden. 8,5% der aufgenommenen Aktivität ließen sich durch eine Extraktion der Zellen mit 75%igem Aceton zurückgewinnen. Auf einem Radioautogramm des Extraktes erschienen außer H-1 selbst nur C-1 und D-1 als markierte Verbindungen, was unsere Annahme, daß H-1 die Vorstufe für die Verbindungen D-1 und C-1 ist, sehr gut stützt.

In die hypothetische Reaktionskette, die vom Phenylalanin über J-3, F-1, H-1 und D-1 zu C-1 führt, läßt sich E-1 auf Grund seiner chemischen Struktur nicht einordnen. Wie wir in der Diskussion noch zu begründen haben,

ist vielmehr anzunehmen, daß J-3 (über die Zwischenverbindungen F-1 und H-1) nicht nur die Vorstufe für D-1, sondern auch der direkte Vorläufer für E-1 ist. Die unmittelbare Abhängigkeit der Produktion von E-1 von der Konzentration der Vorstufe J-3 spiegelt sich deutlich in der gleichsinnigen prozentualen Abnahme der Impulsraten nach 48 bzw. 192 Stunden, während die Impulszahlen für D-1 in den gleichen Zeiträumen infolge der Speisung durch Vorstufenpoole eine Zunahme erfahren.

Die bei der Fütterung von H-1 beobachtete rasche Umwandlung in acetonunlösliche Verbindungen gab Veranlassung zu der Frage, in wie weit H-1 als Vorstufe für das Lignin oder ligninähnliche Stoffe in Frage kommt. Nach einer Hydrolyse der acetonunlöslichen Anteile nach KLASON (1923) mit 72%iger H_2SO_4 bei Zimmertemperatur und anschließender Hydrolyse in 3%iger H_2SO_4 bei $100^{\circ}C$ fanden sich 52% der Aktivität in dem erhaltenen KLASON-Lignin. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der Verbindung H-1 eine Rolle im Lignifizierungsprozeß zukommt.

Neben den Veränderungen der Konzentration der Verbindungen J-3 bis C-1 ist das Verhalten der Chlorogensäure und des Scopolins interessant. Beide Stoffe lassen sich in unseren Geweben im Vergleich zu den Konzentrationen aller übrigen Phenylpropane in auffällig großen Mengen nachweisen, so daß bei erster Betrachtung der Eindruck entsteht, es handle sich bei ihnen um Exkretstoffe, die sich mit zunehmendem Alter der Zellen immer mehr anhäufen (REZNIK, 1960). Tatsächlich erfährt die Impulsrate des Scopolins nach 48 Stunden noch eine Zunahme (24-Stunden-Wert: 490 I/min, 48-Stunden-Wert: 730 I/min). Nach 192 Stunden ist der 48-Stunden-Wert jedoch wieder auf die Hälfte (370 I/min) abgesunken. Viel auffälliger ist der rasche Umsatz der Chlorogensäure. Während das nach 24 Stunden Fütterungszeit angefertigte Radioautogramm (Abb. 13a und 14a) einen Fleck mit 2 080 I/min aufweist, wird bereits nach 48 Stunden der Film an der gleichen Stelle überhaupt nicht mehr geschwärzt. Veränderungen des Scopolin- und Chlorogensäuregehaltes in den Zellen höherer Pflanzen, die auf ein Einschleusen dieser Stoffe in den Grundstoffwechsel schließen lassen, haben SARGENT & SKOOG (1960) und RUCKENBROD (1955) beobachtet. Eine Abnahme der Scopolin- und Chlorogensäuregehalte der Zellen könnte auch durch eine Stoffabgabe nach außen er-

folgen, eine Möglichkeit, die im Fall isolierter Zellen in einer Suspension besonders nahe liegt. Tatsächlich läßt sich in den Medien unserer Gewebekulturen stets Scopoletin nachweisen. Auch bezüglich der Chlorogensäure ist mit einem Austritt in das Medium zu rechnen, in dem sie möglicherweise durch die dort stets nachweisbaren Phenolasen in melaninähnliche Produkte umgewandelt wird, die zu den bräunlichen Verfärbungen älterer Kulturen führen.

D. Diskussion

Die in der Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe häufig gemachte Beobachtung, daß die Bildung der sekundären Pflanzenstoffe an ein reichliches Kohlenhydratangebot gebunden ist (SCHWARZE, 1958; PAECH, 1950; PAECH, 1957), findet in dem hohen Gehalt an Phenylpropanen der mit 2% Saccharose angezogenen Gewebekulturen von NICOTIANA TABACUM var. SAMSUN eine weitere Bestätigung. Die Gewebekulturen weisen wesentlich größere Mengen von Intermediärprodukten des Phenylpropanstoffwechsels auf als etwa Wurzeln von Pflanzen der gleichen Varietät, was sich besonders deutlich in der gegenüber den Wurzeln auf den 5fachen Wert angehobenen Scopoletinkonzentration zeigt. Dieser intensive Phenylpropanstoffwechsel macht die Gewebekulturen zu einem sehr günstigen Objekt für das Studium der Biosynthese der Phenylpropane, da er das Auffinden von Intermediärprodukten erleichtert, deren Konzentrationen in der Pflanze unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

Von den in den Gewebekulturen von NICOTIANA TABACUM gebildeten Phenylpropanderivaten ließen sich in der vorliegenden Arbeit die folgenden Verbindungen isolieren und eindeutig identifizieren: Scopoletin, Scopolin, Dimethyläsculetin, Chlorogensäure, Cumaroylchinasäure, Feruloylchinasäure, Cumaroylglukose, Feruloylglukose. Mit Hilfe der Isotopentechnik gelang es ferner, Spuren freier p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure sowie p-Hydroxy-Phenylbrenztraubensäure und p-Hydroxy-Phenyl-Milchsäure nachzuweisen. Eine weitere Gruppe von Derivaten der p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure, der nach den Markierungsversuchen eine wichtige Rolle im Phenylpropanstoffwechsel unserer Gewebe zukommt, konnte in den Verbindungen J-3, F-1, H-1 und D-1 sowie C-1 und E-1 isoliert werden. In diesen Verbindungen können wir auf Grund der Strukturaufklärung von H-1 und des einheitlichen physikalisch-chemischen Verhaltens der Gruppe Ester der Zimtsäuren mit Aminozuckern vermuten. In unseren Geweben finden sich somit Cumaroyl-, Kaffoyl- und Feruloylderivate, es fehlen Syringoyleinheiten und Zimtsäure. Ebenso fehlt den Geweben unter unseren Versuchsbedingungen die Fähigkeit zur Bildung von Aromaten durch die Kondensation von Acetateinheiten, denn in keinem Fall traten in den Gewebeextrakten Flavonoide oder

Phenole vom Phloroglucin-Resorcintyp auf. Das Fehlen von Syringoylbausteinen in den Gewebeextrakten steht in guter Übereinstimmung mit den Befunden von BERGMANN (1964), der nur eine sehr schwache MÄULE-Reaktion des in den Gewebekulturen von NICOTIANA TABACUM var. SAMSUN gebildeten Lignins beobachtet hat und nach Äthanolyse von Lignin aus den Gewebekulturen keine Syringoyleinheiten unter den HIBBERTschen Monomeren nachweisen konnte. Auffällig ist dagegen das Fehlen der Zimtsäure, die sich auch nach der Fütterung von markiertem Phenylalanin nicht in den Geweben findet. Hier sollte sie als Zwischenprodukt auf dem Weg über die Phenylbrenztraubensäure und Phenylmilchsäure entstehen und zur p-Cumarsäure oxydiert werden (NEISH, 1960; REZNIK 1960). Dagegen finden sich auf den Radiogrammen stets p-Hydroxy-Phenyl-Brenztraubensäure und p-Hydroxy-Phenyl-Milchsäure, deren Auftreten auf die Möglichkeit hinweist, daß das phenolische Hydroxyl schon auf der Stufe des Phenylalanins oder der Phenyl-Brenztraubensäure eingeführt wird. Dieser Bildungsweg der Oxyzimtsäuren ist bisher nur für Gramineen beschrieben worden (NEISH, 1960), jedoch weist SCHMIDT (1962) in einer kürzlich erschienen Arbeit p-Hydroxy-Phenyl-Brenztraubensäure und p-Hydroxy-Phenyl-Milchsäure als Intermediärprodukte der Anthocyansynthese in ANTIRRHINUM MAJUS nach und liefert damit einen Hinweis, daß die Einführung des phenolischen Hydroxyls auch bei Nichtgramineen schon vor der Reduktion der Seitenkette erfolgen kann. In der Tatsache, daß sich in unseren Geweben keine Zimtsäure nachweisen läßt, kann man daher möglicherweise einen weiteren Hinweis auf das Vorkommen dieses Syntheseweges bei Nichtgramineen sehen. Die Entfernung des Stickstoffs aus dem Phenylalanin könnte in unseren Geweben über eine oxydative Desaminierung oder eine Transaminierung erfolgen. Eine dritte Möglichkeit, die direkte Desaminierung von Phenylalanin zu Zimtsäure (KOUKOL & CONN, 1961) läßt sich auf Grund unserer Versuche ausschließen. Einmal müßte bei einer direkten Desaminierung von Phenylalanin-C-14 markierte Zimtsäure auf den Radioautogrammen auftreten, was in unseren Versuchen nicht der Fall war, und zum anderen konnten wir in unseren Geweben keine Phenylalanindeaminase nachweisen.

Das Fehlen von Zimtsäure ist unseren Geweben zeigt sich auch in den Abweichungen der Chlorogensäuresynthese der von uns untersuchten Tabakgewebe von dem von LEVY & ZUCKER (1960) an der Kartoffel aufgedeckten Syntheseweg. Nach den Ergebnissen dieser Autoren findet bei der Kartoffel eine

Veresterung von Zimtsäure mit Chinasäure statt, und die Oxydation des aromatischen Kernes erfolgt an diesem Ester, wobei Cumaroylchinasäure als Zwischenprodukt entsteht.

Die Tatsache, daß in unseren Geweben neben der Chlorogensäure stets geringe Mengen von p-Cumarsäure-Chinasäureester enthalten sind, legt die Vermutung nahe, daß der Cumaroylchinasäureester wie in der Kartoffel ein Zwischenprodukt der Chlorogensäuresynthese ist. Diese Annahme wird erhärtet durch die Umwandlung des aus den Geweben isolierten Cumaroylchinasäureesters in vitro in Chlorogensäure mit einer aus den Gewebekulturen gewonnenen Phenolase. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Kartoffel fehlt jedoch der Zimtsäure-Chinasäure-Ester als Vorstufe des p-Cumarsäureesters. Der verschiedene Ausgangspunkt der Chlorogensäuresynthese in der Kartoffel und in den Tabakgeweben wird weiter durch die Tatsache unterstrichen, daß es bei der Kartoffel nach LEVY & ZUCKER gelingt, durch Fütterung von Zimtsäure und Chinasäure, nicht dagegen durch p-Cumarsäure und Chinasäure, die Chlorogensäuresynthese zu stimulieren, während die Tabakgewebe im Medium gebotene Chinasäure und p-Cumarsäure, dagegen nicht Zimtsäure und Chinasäure, verestern und weiterverarbeiten können. Dieser Unterschied ist angesichts der Verwandtschaft von NICOTIANA TABACUM und SOLANUM TUBEROSUM sehr bemerkenswert und zeigt, wie vorsichtig man bei der Übertragung von Biosyntheseschemata von einem Objekt auf ein anderes sein muß. Während in den Tabakgeweben der Anschluß der Chlorogensäuresynthese an den Zimtsäurestoffwechsel über die p-Cumaroylchinasäure erfolgen dürfte, ist der Abzweigungspunkt der Scopolinsynthese noch unklar. Die chemische Struktur des Scopolins, das als Lacton der Ferulasäure betrachtet werden kann, und die Befunde von REZNIK und URBAN (1957), die nach Fütterung von markierter Ferulasäure an HELIANTHUS ANNUUS, TRITICUM VULGARE und ZEA MAYS markiertes Scopolin nachweisen konnten, legen es nahe, in der Ferulasäure eine unmittelbare Vorstufe des Scopoletins zu erblicken. Für diese Annahme sind jedoch bisher keine näheren Beweise durch eine enzymatische Synthese in vitro oder durch den Nachweis von Zwischenverbindungen erbracht worden. Unsere Versuche, durch Fütterung von Ferulasäure oder H-1 die Scopoletinsynthese in den Geweben zu stimulieren, ergaben ebenso wie die entsprechenden Versuche von KÖTTER (1957) mit Ferulasäure an der Kartoffel keine Erhöhung des Scopoletingehaltes. Es gelang uns auch nicht, eine Lactonisierung von cis-

Ferulasäure auf enzymatischem Wege in vitro zu erreichen oder die hypothetische 2-OH-Ferulasäure (BEST 1948) nach Fütterung mit markiertem Phenylalanin auf den Radioautogrammen zu entdecken.

Die Leichtigkeit, mit der es in unseren Experimenten gelingt, Kaffeesäure in vitro mit einem aus den Geweben gewonnenen Enzym in Äsculetin umzuwandeln, eröffnet die Möglichkeit, daß die Scopoletinsynthese mit dem Ringschluß der Kaffeesäure zum Äsculetin beginnt, das anschließend methyliert wird. Es ergeben sich jedoch auch hier aus unseren bisherigen Experimenten keine weiteren Anhaltspunkte dafür, daß dieser Weg von unseren Zellen beschritten wird, denn es lassen sich weder Äsculetin noch Äsculin als Zwischenprodukte auf den Radioautogrammen nachweisen.

Die Frage nach der Biosynthese des Scopolins muß daher weiter unbeantwortet bleiben. Einen möglicherweise wichtigen Hinweis bei der Suche nach dem Biosyntheseweg ergibt sich aus der von uns beobachteten Tatsache, daß bei kurzfristiger Markierung stets nur markiertes Scopolin und kein markiertes Scopoletin auftritt. Man wird hieraus schließen müssen, daß das Aglykon Scopoletin nicht auf dem Syntheseweg des Scopolins liegt, dessen Synthese offensichtlich über glykosidierte Zimtsäurederivate erfolgt. Das in den Extrakten und im Nährmedium von Flüssigkeitskulturen stets nachweisbare Scopoletin dürfte durch eine Hydrolyse von Scopolin entstanden sein, die wie SARGENT & SKOOG (1960) gezeigt haben, besonders stark bei einer Schädigung der Zellen einsetzt. Das so entstandene Scopoletin dürfte ferner durch eine weitere Methylierung Dimethyläsculetin liefern, das sich in Spuren in unseren Geweben findet.

Das wesentlichste Ergebnis unserer Untersuchungen ist die Isolation einer Gruppe von Zimtsäurederivaten, die in den Rohextrakten verglichen mit den übrigen Phenylpropanen nur in geringen Mengen vorkommen. In der uns bekannten Literatur ist eine derartige Stoffgruppe bisher nicht beschrieben worden. Die Verbindungen spielen jedoch im Phenylpropanstoffwechsel unserer Gewebe eine wesentliche Rolle, wie ihr lebhafter Umsatz nach der Fütterung von radioaktivem Phenylalanin zeigt. Die Verbindungen sind schwer hydrolysierbare Ester, die durch eine hohe Wasserlöslichkeit ausgezeichnet sind und eine ninhydrinpositive Reaktion geben. Sie dürften nach den mit H-1 durchgeführten Identifizierungsversuchen Ester von Aminozuckern darstellen.

Sowohl auf Grund der Substitution des aromatischen Kernes als auch auf Grund des aus den Markierungsversuchen ersichtlichen biogenetischen Zusammenhanges lassen sich die aufgefundenen Verbindungen in 2 Reihen einordnen, die beide von J-3 ihren Ausgang nehmen, deren Zimtsäureanteil die Struktur der p-Cumarsäure aufweist (s. Abb. 15). Ihr folgen in der einen "Reaktionskette" F-1 mit einer Kaffoylstruktur und H-1 mit einer Feruloylstruktur. Aus H-1 gehen D-1 und C-1 hervor, wie sich eindeutig durch die Fütterung von markiertem H-1 an die Gewebe zeigen ließ. Wie aus ihrem chromatographischem Verhalten zu schließen ist (s. Seite 51), müssen sich die beiden Verbindungen D-1 und C-1 von H-1 in einer Veränderung des Aminozukkers unterscheiden. In der zweiten Reihe erscheint E-1 als p-Cumarsäureester, der sich von J-3 durch sein verändertes chromatographisches Verhalten unterscheidet, d.h. ebenfalls durch eine Veränderung des Aminozuckers. Die unmittelbare Abhängigkeit der Bildung von E-1 aus J-3 spiegelt sich deutlich in der gleichsinnigen prozentualen Abnahme der Impulsraten beider Verbindungen wider (vgl. Tabelle 2).

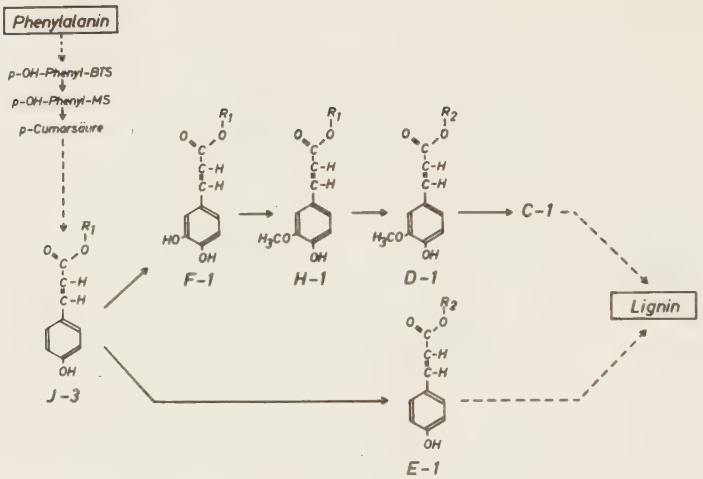


Abbildung 15:

Der biogenetische Zusammenhang der Verbindungen J-3, F-1, H-1, D-1, C-1 und E-1

Wir haben somit in den genannten Verbindungen eine Reaktionskette vor uns, in der stufenweise das Substitutionsmuster des Zimtsäureanteils verändert wird, und von der wir auf Grund der Ergebnisse der Fütterungsversuche annehmen dürfen, daß sie zur Synthese des Lignins führt. Damit stellt sich die Frage, ob der aufgezeigte Weg nur zum Lignin führt. Wahrscheinlich ist dies nicht der Fall. Bereits nach 2ominütiger Inkubation der Zellen mit markiertem Phenylalanin tritt auf den Radioautogrammen neben H-1 und F-1 Chlorogensäure in großen Mengen auf, und es wäre denkbar, daß diese ebenfalls über J-3 gebildet würde. Diese Annahme erscheint sehr reizvoll. da der Abfluß in zwei Synthesewege erklären würde, warum der J-3-Pool erst relativ spät auf den Chromatogrammen in Erscheinung tritt.

Zum Schluß soll noch kurz auf die Diskrepanz hingewiesen werden, die zwischen dem hohen Anteil der Aminozuckerderivate an den Phenylpropanen besteht, der nach Fütterung von Phenylalanin beobachtet wird, und den geringen Mengen dieser Verbindungen, die in den Rohextrakten aufgefunden werden. Diese Diskrepanz könnte sich dadurch erklären lassen, daß durch die Desaminierung des Phenylalanins ein plötzliches Angebot von Aminogruppen in der Zelle entsteht, das zu einer verstärkten Bildung von Aminozuckern führt. Es ergeben sich so aus der vorliegenden Arbeit eine Reihe von Fragen, die weiter bearbeitet werden sollen.

Zusammenfassung

1) Aus Gewebekulturen von NICOTIANA TABACUM var. SAMSUN wurden folgende Phenylpropanderivate isoliert und identifiziert: Scopoletin, Scopolin, Dimethyläsculetin, Chlorogensäure, p-Cumaroylchinasäure, Feruloylchinasäure, p-Cumaroylglukose, Feruloylglukose, p-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, p-Hydroxyphenylmilchsäure.

2) Eine Reihe weiterer, aus NICOTIANA-Geweben isolierter Phenylpropane konnten als schwer hydrolysierbare Ester der p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure identifiziert werden. Die bisherigen Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß es sich um Esterglykoside von Aminozuckern handelt. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Vertreter werden beschrieben, und der aus dem chromatographischen Verhalten sowie durch Markierungsversuche ermittelte biogenetische Zusammenhang wird erörtert. Für den Hauptvertreter der Gruppe konnte der Einbau in das Lignin beobachtet werden.

3) In einem Nährmedium mit Zusatz von 2% Saccharose kultivierte Suspensionen einzelner Zellen und wenigzelliger Aggregate von NICOTIANA TABACUM var. SAMSUN weisen einen intensiven Phenylpropanstoffwechsel auf, der für das Studium der Kinetik des Ein- und Umbaues von Phenylpropanen in höheren Pflanzen besonders geeignet ist. Im Medium gebotenes Phenylalanin wird innerhalb weniger Minuten von den Zellen aufgenommen; die ersten Umbauprodukte können bereits nach 2o min Fütterungsdauer nachgewiesen werden.

4) Suspensionskulturen von NICOTIANA TABACUM verestern in vivo im Medium gebotene p-Cumarsäure und Chinasäure. Der auch unter normalen Anzuchtbedingungen in den Zellen auftretende Ester läßt sich mit einer Phenolase aus den Tabakgeweben in vitro zu Chlorogensäure oxydieren.

5) Versuche in vivo und in vitro erbrachten keine Anhaltspunkte dafür, daß die Ferulasäure eine Vorstufe des Scopoletins ist. Dagegen bietet die enzymatische Umwandlung von Kaffeesäure in Äsculetin den Ansatz, die Scopoletin-Biosynthese über eine Lactonbildung der Kaffeesäure und anschließende Methylierung zu diskutieren.

L i t e r a t u r

Axelrod, J. and R. Tomchick: Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. J. Biol. Chem. 233, 7o2 (1958).

Baschang, G.: Aminozucker, Synthesen und Vorkommen in Naturstoffen. Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 2o, 2oo (1962).

Bate-Smith, E.C.: The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance: I. Dicotyledons. J. Linn. Soc., Lond., Bot. 58, 95 (1962).

Bekemeier, H.: Zur Papierchromatographie einfacher Phenole, aromatischer Oxycarbonsäuren und aromatischer Oxycarbonsäureamide in sauren und alkalischen Medien. Pharmazie 4, 181 (1957).

Bergmann, L.: Growth and division of single cells of higher plants in vitro. J. Gen. Physiol. 43, 841 (196o).

- Die Wirkung von 6-Furfurylaminopurin auf die Atmung von Zellsuspensionen von NICOTIANA TABACUM. Z. Naturf. 18b, 942 (1963).

- Der Einfluß von Kinetin auf die Ligninbildung und Differenzierung in Gewebekulturen von NICOTIANA TABACUM var. SAMSUN. Planta 1964 (im Druck).

Best, R.J.: Studies on a fluorescent substance in plants: 3. The distribution of scopoletin in tobacco plants and some hypotheses on its part in metabolism. Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 26, 223 (1948).

Birkofer, L., Chr. Kaiser, W. Nouvertne und U. Thomas: Natürlich vorkommende Zuckerester von Phenolcarbonsäuren. Z. Naturf. 16b, 249 (1961).

Brauns, F.E. and D.A. Brauns: The Chemistry of Lignin. Suppl. Vol., N.Y., 196o.

Cartwright, N.J. and R.D. Haworth: The consituents of natural phenolic resins. Part XIX: The oxidation of ferulic acid. J. Chem. Soc., Lond. 535 (1944).

Cartwright, R.A. and E.A.H. Roberts: Theogallin as a galloyl ester of quinic acid. Chem. & Ind. 23o (1955).

Cheronis, N.D. and J.B. Entrikin: Semimicro Qualitative Organic Analysis, Interscience publishers, N.Y. 1961.

Finkle, B.J. and R.F. Nelson: Finding of an O-methyltransferase in plant tissues. Plant Physiol. 38, lviii (1963).

Freudenberg, K.: Forschungen am Lignin. Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 2o, 41 (1962).

Freudenberg, K. und B. Lehmann: Aldehydische Zwischenprodukte der Lignin-bildung. Chem. Ber. 93, 1354 (196o).

Freudenberg, K. und K. Schuhmacher: UV-Absorptionsspektren von künstlichem und natürlichem Lignin sowie Modellverbindungen. Sitzungsber. Heidelberger Akad. Wiss., Math.-nat. Klasse, 1953/55, 3. Abhandl. (1956).

Frey-Wyssling, A. und J.W. Szarkowski: Über die Aktivität der Tyrosinase in Tabaksamen. Experientia 15, 462 (1959).

Grisebach, H. and W.D. Ollis: Biogenetic relationships between coumarins, flavonoids, Isoflavonoids and rotenoids. Experientia 17, 4 (1961).

Hais, I.M. und K. Macek: Handbuch der Papierchromatographie, Band I, Jena 1958.

Hanson, K.R. and M. Zucker: The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hydroxycinnamic acids. Chromatographic separations and characterisation. J. Biol. Chem. 238, 11o5 (1963).

Harborne, J.B. and J.J. Corner: Plant polyphenols: 4) Hydroxycinnamic acid-sugar derivates. Biochem. J. 81, 242 (1961).

Haworth, R.D.: Natürlich vorkommende Phenole. Österr. Chemiker-Zeitung 62, 377 (1961).

Jurd, L.: The detection of aromatic acids in plant extracts by the ultra-violet absorption spectra of their ions. Arch. Biochem. Biophy. 66, 284 (1957).

Karkhanis, Y. and E. Frieden: On the induction period and a protein inhibitor of mushroom tyrosinase. J. Biol. Chem. 236, PC1 (1961).

Karrer, W.: Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe. Basel 1958.

Kertesz, D. and R. Zito: Oxygenases. Ed.: O. Hayaishi. Academ. Press, N.Y. 1962.

Klason, P.: Über den Ligningehalt des Fichtenholzes. Cellulosechemie 4, 81 (1923).

Koblitz, H.: Die Chemie der Zellwand in vitro kultivierter pflanzlicher Gewebe. II: Kinetin-induzierte Ligninbildung, eine neue Eigenschaft des Kinetins. Faserforschung und Textiltechnik, 13, 231 (1962).

Kötter, Cl.: Biochemische Untersuchungen an phytophthorakranken Kartoffelknollen, Diss., Göttingen 1957.

Koukol, J. and E.E. Conn: The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV: Purification and properties of the phenylalanine deaminase of HORDEUM VULGARE. J. Biol. Chem. 236, 2692 (1961).

Kovacs, P.: Über den Einfluß von Natrium-L-Ascorbat auf die Monophenoloxydase-Aktivität des Phenolase-Komplexes. Naturwiss. 49, 395 (1962).

Levy, C.C. and M. Zucker: Cinnamyl and p-coumaryl esters as intermediates in the biosynthesis of chlorogenic acid. J. Biol. Chem. 235, 2418 (1960).

Masamune, H., H. Sinohara and T. Okuyama: Biochemical studies on carbohydrates CCXVI: On conditions of acetolysing molisch-positive mucopolysaccharides. Tohoku J. exp. Med. 68, 165 (1958).

Neish, A.C.: Biosynthetic pathway of aromatic compounds. Ann. Rev. Plant Physiol. 11, 55 (1960).

Paech, K.: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Göttingen 1950.

- Carotinoidbildung und Stickstoffumsatz. Planta 48, 587-591 (1957).

Reznik, H.: Vergleichende Biochemie der Phenylpropane. Ergebnisse der Biologie 23, 14 (1960).

Reznik, H. und R. Urban: Über den Metabolismus von C-14-markierter Ferulasäure. Naturwiss. 44, 13, 1957.

Riley, R.F.: Paper partition chromatography of some simple phenols. J.Am. Chem. Soc. 72, 5782 (1950).

Roberts, E.A.H. and D.J. Wood: Separation of tea polyphenols on paper chromatograms. Biochem. J. 53, 332 (1953).

Rolland, M. et S. Lissitzky: Oxidation of tyrosine and tyrosine- containing peptides by mushroom polyphenol oxidase. I: Oxidation of tyrosine and peptides containing it in the presence of ascorbic acid. B.B.A. 56, 83 (1962).

Ruckenbrod, H.: Untersuchungen über den Umsatz der Chlorogensäure in höheren Pflanzen. Planta 46, 19 (1955).

Runeckles, V.C. and K. Woolrich: Tobacco polyphenols. I: The biosynthesis of O-glucosides and O-glucoseesters of hydroxycinnamic acids. Phytochemistry 2, 1-6 (1963).

Sargent, J.A. and F. Skoog: Effects of indoleacetic acid and kinetin on scopoletin-scopolin levels in relation to growth of tobacco tissues in vitro. Plant Physiol. 35, 934 (1960).

- Scopoletin glycosides in tobacco tissue. Physiol. Plantarum 14, 504 (1961).

Schmidt, H.: Chemische Untersuchungen über den Biosyntheseweg der Blütenfarbstoffe in Mutanten von ANTIRRHINUM MAJUS. Biol. Zentralbl. 81, 213 (1962).

Skoog, F. and E. Montaldi: Auxin-Kinetin interaction regulating the scopoletin and scopolin levels in tobacco tissue cultures. Proc. Nat. Acad. Scie. 47, 36 (1961).

Street, H.E. and G.G. Henshaw: Cell division and differentiation in suspension cultures of higher plant cells. Symp. of the Soc. for exp. Biol., Nr. XVII, Cell Differentiation, 1963.

Schwarze, P.: Phenole und Chinone und die biogene Bildung von Benzolkernen bei höheren Pflanzen. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie X, 523, Göttingen 1958.

White, P.R.: The cultivation of animal and plant cells. N.Y. 1954.

Williams, A.H.: Paper chromatography of cumaric acid derivates. Chem. & Ind. 12o (1955).

Yoshida, S. and M. Hasegawa: A microcolometric method for the determination of shicimic acid. Arch. Biochem. Biophys. 7o, 377 (1957).

Meinem hochverehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. Andre Pirson,
gilt mein besonderer Dank für
sein Interesse und die freundliche
Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Privatdozenten Dr. Ludwig Bergmann
danke ich herzlich für das stete
Interesse am Fortgang meiner Arbeit und
die vielen anregenden Diskussionen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei
an dieser Stelle für ihre finanzielle
Unterstützung gedankt.

Lebenslauf

Am 16.8.1933 wurde ich in Frankfurt/Oder als Sohn des Oberstabsintendanten Rudi Thies und seiner Ehefrau Lucia, geb. Brauer, geboren.

Nach meiner Schulausbildung in einer Grundschule in Frankfurt/Oder sowie in Oberschulen in Frankfurt/Oder, Ammendorf bei Halle und Hildesheim begann ich 1952 mit dem Zeugnis der Mittleren Reife in einer Hildesheimer Technischen Großhandlung eine kaufmännische Lehre, die ich im Herbst 1954 mit der Handlungsgehilfenprüfung abschloß. Der Besuch von Abendkursen während meiner Lehrtätigkeit ermöglichte es mir, im Frühjahr 1955 das Reifezeugnis zu erlangen.

Im Sommersemester 1955 begann ich ein Studium in den Fächern Botanik, Zoologie, Chemie und Physik an der Universität Göttingen, das ich im Wintersemester 1957/58 an der Universität München fortsetzte. Für die Dauer des Sommersemesters 1958 und des Wintersemesters 1958/59 war ich als Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft am National Research Centre in Kairo tätig. Im Sommersemester 1959 setzte ich mein Studium in Göttingen fort und begann im Frühjahr 1961 im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen die vorliegende Dissertationsarbeit.

Meine akademischen Lehrer waren in den Hauptfächern die Herren Prof. Pirson, Dr. Bergmann, Prof. Harder, Prof. Firbas, Dr. Metzner, Prof. Barthelmeß, Prof. Birukow, Prof. Henke, Prof. Piepho, Prof. Ulrich, Prof. v. Frisch, Prof. Lorenz, Prof Deuticke und Prof. Thiele.